



(51) 国際特許分類6 C12N 9/10, 15/54, 5/10, 1/21, C12P 21/02, 19/04	A1	(11) 国際公開番号 WO98/26053 (43) 国際公開日 1998年6月18日(18.06.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04546 (22) 国際出願日 1997年12月10日(10.12.97) (30) 優先権データ 特願平8/332411 1996年12月12日(12.12.96) JP 特願平9/161462 1997年6月18日(18.06.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社(KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 小栗 秀(OGURI, Suguru)[JP/JP] 〒093 北海道網走市潮見3-6-5 ハイツ望潮B-1-8 Hokkaido, (JP) 箕輪真理(MINOWA, Mari)[JP/JP] 吉田有人(YOSHIDA, Aruto)[JP/JP] 竹内 誠(TAKEUCHI, Makoto)[JP/JP] 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP) 谷口直之(TANIGUCHI, Naoyuki)[JP/JP] 〒560 大阪府豊中市上野東2-19-32-201 Osaka, (JP)		(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: NOVEL β1→4 N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE AND GENE ENCODING THE SAME (54) 発明の名称 新規 β 1→4N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、それをコードする遺伝子 (57) Abstract A novel enzyme having a β 1→4 N-acetylglucosaminyltransferase (GnT-IV) activity; a gene encoding this enzyme; a recombinant DNA containing this gene; a host cell containing this recombinant DNA; a process for producing the enzyme protein having the GnT-IV activity by culturing the host cell in a medium; and saccharides having sugar chains modified by GnT-IV. The invention provides novel GnT-IV, a process for producing the same, and a gene encoding this enzyme. This novel GnT-IV makes it possible to produce branched saccharides which cannot be formed by the existing glycosyltransferases. Therefore, it contributes to the production and improvement of drugs, reagents and foods of complex saccharide type and is useful in modifying the sugar chain structure of any biopolymer.		

(57) 要約

本発明は、新規な $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (GnT-IV) 活性を有する酵素、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組み換え体DNA、該組み換え体DNAを含む宿主細胞、該宿主細胞を培地に培養してGnT-IV活性を有する酵素蛋白質を生産する方法、およびGnT-IVを用いて糖鎖を改変した糖質に関する。

本発明によれば、新規なGnT-IV及びその製造方法、ならびに該酵素をコードする遺伝子が提供される。本発明のGnT-IVは、既知の糖転移酵素では形成できなかった分岐構造の糖質を生産することが可能となり、複合糖質型の医薬品、試薬、食品の製造や改良に役立つとともに、あらゆる生体高分子の糖鎖構造の改変に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AU	オーストラリア	GE	ジョージア	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GN	ギニア	MK	マケドニア	TR	トルコ
BF	ブルキナ・ファソ	GW	ギニア・ビサウ		マラヴィア共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ベトナム
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YW	ウイグル
CG	コンゴ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CH	スイス	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CI	コートジボワール	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CM	カメルーン	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CN	中国	KR	韓国	PR	プルトニア		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
CY	キプロス	LC	セント・ルシア	SE	スウェーデン		
CZ	チェコ	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	SI	スロベニア		
DK	デンマーク	LS	レソト	SK	スロヴァキア		
EE	エストニア			SL	シエラ・レオネ		
ES	スペイン						

明 細 書

新規 $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、
それをコードする遺伝子

技術分野

本発明は、糖質中の特定の糖鎖構造を認識して、GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 4$ 分岐構造を導入する新規なN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（GlcNAc転移酵素）に関するものである。

背景技術

1. 糖タンパク質について

自然界に存在するタンパク質のほとんどは、アミノ酸のみから成る単純タンパク質ではなく、糖鎖やリン酸・脂質などが結合した「成熟」タンパク質の形で存在する。従って、大腸菌を生産宿主とした単純タンパク質型の製品開発には、タンパク質の成熟過程を欠くために起因する様々な問題が生じた。特にサイトカイン類など分泌型生理活性タンパク質は少数の例外を除きすべて糖タンパク質であるため、バイオ医薬開発の最大のポイントとして、糖鎖の機能・役割が着目されている。

糖タンパク質の糖鎖には、大別して、Asn 結合型・ムチン型・O-linked GlcNAc 型・GPI-アンカー型・プロテオグリカン型などがあり [竹内誠, グリコバイオロジーシリーズ 5, グリコテクノロジー, 木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編, 講談社サイエンティフィック, (1994), 191-208]、それぞれ固有の生合成経路を持ち、個別の生理機能を担っている。Asn 結合型糖鎖は、カビ・酵母から、昆虫・植物及び動物界に広く分布しており、基本的な生合成経路は種を越えて保存されている（第1図）。生合成的に共通なコア糖鎖部分の外側（非還元末端側と呼ぶ）には、生物種に特徴的な糖鎖が形成される。 $\alpha 1,6$ 結合で伸長する主鎖に $\alpha 1,3$ 及び $\alpha 1,2$ 分岐のマンノースが結合して形成されるマンナン型糖鎖は、酵母を始めとする菌類に特徴的な糖鎖構造である（第2図, a） [中島佑, 糖鎖工

学，産業調査会，(1992)，384-397]。一方、昆虫・植物・動物では、マンノース残基の伸長は見られず、Dolichol中間体から転移を受けた糖鎖がトリミングされただけの形のハイマンノース型（第2図，b）が形成される。昆虫・植物・軟体動物などでは、特徴的なキシロースなどを配した独特の構造（第2図，c）も見られる。動物ではいったんトリミングされた糖鎖にGlcNAcの分岐構造が形成され、ガラクトース、シアル酸など複数種の単糖が複雑な構造を形成するコンプレックス型糖鎖（第2図，d）や、コンプレックス型糖鎖とハイマンノース型糖鎖の混在する、ハイブリッド型糖鎖（第2図，e）などの特徴的な糖鎖構造が見られる〔古川清，糖鎖工学，産業調査会，(1992)，64-75〕。

以上のような糖鎖は、細胞表層タンパク質や分泌タンパク質のほとんどに付与され、細胞やタンパク質の個性を決定づける重要な役割を演じているものと考えられている。中でも、共通コア糖鎖からアンテナ状に伸びる分岐を形成する糖鎖構造部分は、分岐糖鎖構造と呼ばれ、生体認識リガンド（つまり、糖鎖の先端部分）に高度な自由度を与えつつ多点認識のチャンスをつくり、かつ、空間占有体積を飛躍的に増大させることでタンパク質部分に対する保護能を最大限高める機能を担っていると考えられる（竹内誠ら，前出）。従って、糖鎖の分岐構造をコントロールすることにより、糖タンパク質の生理機能・体内安定性・体内動態・臓器ターゲティング特性を様々に改変することができる。このことから糖鎖分岐構造の制御技術は、“ヒトに優しい”糖タンパク質型医薬品開発のための次世代バイオ技術として期待されている。

2. 糖タンパク質糖鎖の生理的意義について

分泌型糖タンパク質の糖鎖は糖タンパク質の生合成、細胞内ソーティング、抗原性の隠蔽、生体内安定性、臓器ターゲティング特性などの優れた機能を示す。さらに、細胞表層糖タンパク質糖鎖は、細胞の分化・病変・ガン化等の変化に応じて変化することが知られており、特にガンの転移と糖鎖の分岐構造との間に密接な関係があることが報告されている。

(1) 抗原性の隠蔽

糖鎖は、立体構造上の自由度が高く、まるでプロペラのように気ままに運動し

ていると考えられる。そのため、糖鎖に対してアフィニティーを持たないタンパク質分子（プロテアーゼやタンパク質に対する抗体など）は糖鎖に振り払われ、タンパク質部分に接近できない。従って、もし糖鎖結合部位付近のペプチド部分に抗原性があっても、抗体分子はそこに近づくことができず、抗原抗体反応は極めて起こり難くなる。また、糖タンパク質がマクロファージに捕食され、分解産物が抗原呈示される時も、糖鎖結合部位周辺のペプチドにはレセプターが接近しにくく、抗原刺激が起こり難い。実際、卵白リゾチームの抗原ペプチドの中央付近に糖鎖を導入すると、MHC class II 分子との結合が著しく阻害されることが報告されている [Mouritsen, S., Meldal, M., Christiansen-Brands, I., Elsnæ, H. and Werdelin, O., *Eur. J. Immunol.*, (1994), 24, 1066-1072]。このような抗原性の隠蔽効果は糖鎖の占める空間容積が大きいほど高くなるので、分岐構造の発展による寄与は大きいと考えられる。

(2) 生体内安定性

遺伝子組換え動物細胞を宿主として生産された史上初の糖タンパク質型医薬品となったエリスロポエチンについては、その糖鎖の機能が徹底的に調べられた。その結果、エリスロポエチンの糖鎖は受容体との結合には阻害的に働くが、活性構造の保持、および体内動態の改善に決定的な寄与があり、全体として薬理活性の発現に必要不可欠であることが示された [Takeuchi, M. and Kobata, A., *Glycobiology*, (1991), 1, 337-346]。特に、糖鎖のアンテナ数とエリスロポエチンの薬理効果との間に強い相関性が見いだされ、いままで注目されることのなかった分岐構造（コア糖鎖に結合する GlcNAc によって形成される枝分れ構造）の重要性が初めて明らかにされた [Takeuchi, M., Inoue, N., Strickland, T. W., Kobata, M., Wada, M., Shimizu, R., Hoshi, S., Kozutsumi, H., Takasaki, S. and Kobata, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1989), 86, 7819-22]。分岐構造の発達していないエリスロポエチンでは腎でのクリアランスが早まり、結果として体内滞留時間が短くなることがこの現象の主な原因であると報告されている [Misaizu, T., Matsuki, S., Strickland, T. W., Takeuchi, M., Kobata, A. and Takasaki, S., *Blood*, (1995), 86, 4097-4104]。

(3) 臓器ターゲティング特性

生体組織の多くはレクチン様レセプターを持っており、cell-cell interaction に用いたり、血中から糖タンパク質を取り込むのに利用している。肝臓のアシアロタンパク質結合レクチンは老化した糖タンパク質のクリアランス系の代表例 [川寄敏祐, 糖鎖工学, 産業調査会, (1992), 125-136] である。その他にも、血管内皮細胞・血小板・白血球の持つ selectin (川寄敏祐, 同上) や、マクロファージ・NK 細胞表層のレクチンレセプター (川寄敏祐, 同上) がよく知られている。また、糖タンパク質だけでなく、細胞も糖鎖をリガンドとして特定組織に集合する現象が知られており、骨髄細胞の homing [入村達郎, グリコバイオロジーシリーズ 3, 細胞社会のグリコバイオロジー, 永井克孝・箱守仙一郎・木幡陽編, 講談社サイエンティフィック, (1993), 127-175] や炎症部位への好中球のリクルート (入村達郎, 同上) などの例が詳しく調べられている。以上を統合すると、糖タンパク質や細胞はその糖鎖構造により、すべての臓器とはいかないまでも、血流中にレクチン・レセプターを呈示している特定の臓器・組織へのターゲティング特性を持っていることが十分に考えられる。このことは、糖鎖によるドラッグ・デリバリーへの道を開くものである。その場合、レクチンの糖鎖に対する親和性は、糖鎖リガンドの自由度と数に大きく左右されるため、糖鎖の分岐構造が最大のポイントとなる。

(4) 細胞の病変と糖鎖分岐構造との相関性 [加藤順子, 鈴木直子, 糖鎖工学と医薬品開発, 医薬品副作用被害救済・研究振興基金編, 薬業時報社, (1994), 107-13214)]

多分岐型糖鎖構造を検出するプローブとして、L-PHA という植物レクチンが開発されると、様々な病変組織標本が調べられるようになった。その結果、一部のガン細胞、特に転移能の高いガン細胞が L-PHA でよく染まる傾向が見出され、糖鎖の分岐構造とガンの転移能との相関性が気付かれるようになった。human chorionic gonadotropin (hCG) は妊娠初期の絨毛組織で盛んに生合成される glycoprotein hormone である。かなりの量が尿中に排出されるので、妊娠の指標として臨床利用されている。この hCG の Asn 結合型糖鎖は、1分岐及び2分岐複合型を主体とする特徴的なものであるが、栄養膜腫瘍 (Trophoblastoma) から、侵食性母斑 (Invasive mole)、さらには絨毛癌 (Choriocarcinoma) とガンが悪性度

を増すにつれ、2, 4, 2型3 分岐鎖および異常2分岐鎖（いずれも1分岐鎖及び2分岐鎖に GnT-IV が作用した型）の出現することが報告されている [山下克子, 蛋白質・核酸・酵素, (1992), 37, 1880-1888]。その原因として GnT-IV が絨毛ガンの悪性化に連動して活性上昇する可能性が示唆されている。

γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP) は、肝臓に特異的に多く存在する糖タンパク質である。血清中の γ -GTP は種々の肝臓疾患に従って劇的に増加することから、肝疾患の指標として臨床応用されている。さらに Yamashita ら [Yamashita, K., Totani, K., Iwaki, Y., Takamisawa, I., Tateishi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y. and Kobata, A., J. Biochem., (1989), 105, 728-735] は、 γ -GTP の糖鎖構造が細胞のガン化により、hCG と類似の分岐構造異常を起こすことを見出し、ガン化と GnT-IV 活性化との相関性を報告している。正常ヒト肝細胞由来 γ -GTP の Asn 結合型糖鎖は2分岐複合型を主体とし、少量の3分岐鎖、4分岐鎖も混在する分布のものであるが、ヒト肝ガン細胞由来のものは、著しい分岐構造の昂進が見られ、同時に少量ではあるが、正常細胞由来のものには見られなかったハイマンノース型糖鎖および異常2分岐鎖が出現していた。その原因として、N-アセチルグルコサミン転移酵素 -IV (GnT-IV) および-V がガン化に伴って活性化した可能性が示唆されている (Yamashita ら, 同上)。

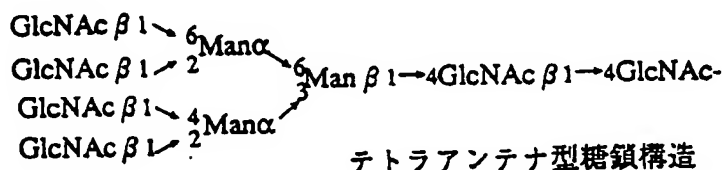
細胞の糖タンパク質の糖鎖分岐構造は、ウィルスの感染によっても激しく変化することが報告されている (Yamashita ら, 同上)。BHK 細胞はテトラアンテナ型までの分岐糖鎖構造を持っている。これをポリオーマウイルスでトランスフォームすると、細胞の生産する糖タンパク質糖鎖のうちバイアンテナリー型が減少し、かわりにテトラアンテナ型および N-アセチルラクトサミンのリピート構造が増加し、全体として分岐数の著しい昂進が認められた [Takasaki, S., Ikehira, H. and Kobata, A., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1980), 90, (3), 735-742]。その原因としては、GnT-IV、-V および i-GnT の活性化が考えられる。

。

3. 糖タンパク質の分岐糖鎖構造関連酵素について

動物に特徴的な糖タンパク質糖鎖構造である複合型糖鎖は、共通コア型糖鎖に

アセチルグルコサミン (GlcNAc) が様々な結合し、複雑な分岐構造を形成している (古川清, 前出) (第1図)。この分岐構造は生体内外における糖タンパク質の安定性、局在性、生物活性、薬理特性と密接な関係があるため (竹内誠, 前出)、その生合成過程が詳しく調べられて来た。H. Schachterらは基質に工夫して、Hen oviduct 中の各酵素活性を区別し、GnT-I~VIまでのGlcNAc分岐形成酵素 (GlcNAc糖転移酵素群; 第3図) の存在を予言した [Glesson, P. A. and Schachter, H., J. Biol. Chem., (1983), 258, 6162-6173]。その後、GnT-I [Kumar, R., Yang, J., Larsen, R. D. and Stanley P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1990), 87, 9948-9952、Sarkar, M., Hull, E., Nishikawa, Y., Simpson, R. J., Moritz, R. L., Dunn, R. and Schachter, H., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, (1991), 88, 234-238]、GnT-II [D'Agostaro, G.A., Zingoni, A., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Schachter, H. and Bendiak, B., J. Biol. Chem., (1995), 270, 15211-21]、GnT-III [Nishikawa, A., Ihara, Y., Hatakeyama, M., Kangawa, K. and Taniguchi, N., J. Biol. Chem., (1992), 267, 18199-18204]、GnT-V [Shorebah, M. G., Hindsgaul, O. and Pierce, M., J. Biol. Chem., (1992), 267, 2920-2927、Gu, J., Nishikawa, A., Turuoka, N., Ono, M., Yamaguchi, N., Kangawa, K. and Taniguchi, N., J. Biochem., (1993), 113, 614-619] が次々と精製され、遺伝子がクローニングされた。しかし、これらの既知GlcNAc転移酵素だけでは、代表的なヒトの血中糖タンパク質として知られる α 1酸性糖タンパク質 [Yoshima, K., Tsuji, T., Irimura, T. and Osawa, T., J. Biol. Chem., (1984), 259, 10834-10840] やエリスロポエチン [Takeuchi, M., Takasaki, S., Shimada, M. and Kobata, A., J. Biol. Chem., (1990), 265, 12127-12130] に見られる主要糖鎖 (テトラアンテナ型、下記式) を形成することはできないため、GnT-IVに相当する基質及び反応特異性を持ったアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼがMissing linkとして探し求められてきた。



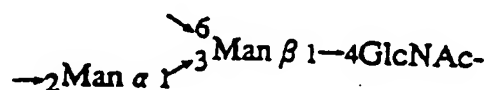
アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼとしては、上記の他に、ムチン型糖鎖に作用するもの [Bierhuizen, M. F., Maemura, K. and Fukuda, M., J. Biol. Chem., (1994), 269, 4473-4479]、糖脂質に作用するものや、I・i-抗原構造として知られる糖鎖エпитープを形成するもの [Kawashima, H., Yamamoto, K., Osawa, T. and Irimura, T., J. Biol. Chem., (1993), 268, 27118-27126、Bierhuizen, M. F., Mattei, M. G. and Fukuda, M., Genes Dev., (1993), 7, 468-478]について精製あるいは遺伝子のクローニングがなされているが、基質特異性や転移されたGlcNAc基の結合様式が異なり、いずれもGnT-IV様の生成物を与えない。

発明の開示

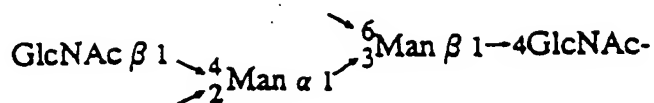
本発明の課題は、 $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（以下、GnT-IVという）活性を有する酵素、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組み換え体DNA、該組み換え体DNAを含む細胞、該細胞を培地に培養してGnT-IV活性を有する酵素タンパク質を生産する方法、およびGnT-IVを用いて糖鎖を改変した糖質を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、ウシ小腸より、GnT-IV 酵素タンパク質を単離精製し、その生化学的性質を明らかにするとともに、その部分アミノ酸配列をもとに、同組織のcDNAライブラリー及びmRNAからウシGnT-IVa 遺伝子をクローニングすることに成功した。さらに、ウシGnT-IVa 遺伝子をもとにしてヒト肝臓・ヒト肺のcDNA ライブラリーおよびmRNAからそれぞれヒトGnT-IVa ・ヒトGnT-IVbの2つの遺伝子をクローニングすることに成功した。そして、これらの遺伝子産物がGnT-IV活性を示すことを確認することにより、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明の第1の発明は、糖供与体としてUDP-GlcNAcを、糖受容体として下記式：



で表される部分構造を有する糖質をそれぞれ基質とし、下記式：



で表される部分構造を有する糖質を生成する作用を有するGnT-IVである。

本発明の第2の発明は、配列番号18記載のアミノ酸配列、または配列番号18記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつGnT-IV活性をもたらすアミノ酸配列を有するGnT-IV；配列番号24記載のアミノ酸配列、または配列番号24記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつGnT-IV活性をもたらすアミノ酸配列を有するGnT-IV；配列番号37記載のアミノ酸配列、または配列番号37記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつGnT-IV活性をもたらすアミノ酸配列を有するGnT-IVである。

本発明の第3の発明は、配列番号18記載のアミノ酸配列、または配列番号18記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつGnT-IV活性をもたらすアミノ酸配列を有するGnT-IVをコードするGnT-IV遺伝子；配列番号24記載のアミノ酸配列、または配列番号24記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつGnT-IV活性をもたらすアミノ酸配列を有するGnT-IVをコードするGnT-IV遺伝子；配列番号37記載のアミノ酸配列、または配列番号37記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつGnT-IV活性をもたらすアミノ酸配列を有するGnT-IVをコードするGnT-IV遺伝子；配列番号17記載の塩基配列を有するGnT-IV遺伝子；配列番号23記載の塩基配列を有するGnT-IV遺伝子；配列番号36記載の塩基配列を有するGnT-IV遺伝子である。

本発明の第4の発明は、上記のいずれかのGnT-IV遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする組み換え体DNA；上記のいずれかに記載のGnT-IV遺伝子の

一部もしくは全部を含む染色体断片である。

本発明の第5の発明は、上記組み換え体DNAを含む宿主細胞；上記染色体断片を人為的に導入した宿主細胞である。

本発明の第6の発明は、上記宿主細胞を培地に培養し、培養物からGnT-IVを採取することを特徴とするGnT-IVの製造法；上記宿主細胞を起源とする宿主の分泌物・体液・ホモジネートからGnT-IVを採取することを特徴とするGnT-IVの製造法である。

本発明の第7の発明は、生物試料から上記GnT-IVを精製する方法である。

本発明の第8の発明は、上記GnT-IVにより糖鎖構造を改変した糖質である。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のGnT-IV遺伝子は以下のようにして単離することができる。

ウシGnT-IVa 遺伝子の取得

まず、ウシ小腸のミクロソーム画分を界面活性剤で可溶化したものについて、陰イオン交換樹脂・銅キレートカラム・2段階の基質アナログによるアフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過の一連の操作を加えることによりGnT-IV酵素の精製標品を得る。得られた精製標品をSDS-PAGE にかけて、さらに、PVDF膜上に転写したものについてそのまま、もしくは、限定水解後、気相アミノ酸シーケンサーで分析することにより本酵素の部分アミノ酸配列を得る。

次いで、動物細胞（ウシ小腸）より抽出したRNA を鋳型とし、上記で配列決定した部分アミノ酸配列をもとに設計したプライマーを用いて、RT-PCR を行う。さらに、RT-PCR により得られた断片をプローブとし、ブランクハイブリダイゼーションにより、前記組織由来のcDNA ライブラリーから目的とする GnT-IVa 遺伝子をスクリーニングする。得られたポジティブブランクに含まれるcDNA断片を切り出し、pUC19などのベクターにサブクローンし、塩基配列を解析する。タンパク質をコードする部分の全長がとれていなければ、必要に応じてサブクローンした断片の一部をプローブとして再びブランクハイブリダイゼーションを行うか、得られた塩基配列情報をもとにRACE法などでcDNAの末端部を取得する。このようにしてクローニングされたGnT-IVa 遺伝子の全塩基配列の解析を行い、次い

で前記塩基配列を有する遺伝子によって翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を確定する。このアミノ酸配列は、配列番号18に示されるとおりである。

ヒトGnT-IVa 遺伝子、ヒトGnT-IVb 遺伝子の取得

ヒト GnT-IVa 遺伝子、ヒト GnT-IVb遺伝子は、前述のようにして得られたウシGnT-IVa 遺伝子の塩基配列情報をもとにヒト組織（肝臓または肺）より抽出したRNA を用いた RT-PCR およびこれらの組織由来の cDNA ライブラリーのスクリーニングにより得られる。得られたヒト GnT-IVa 遺伝子、ヒト GnT-IVb遺伝子の全塩基配列の解析を行い、次いでこれらの遺伝子によって翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を確定する。これらのアミノ酸配列は配列番号24、37に示される通りである。

一方、配列番号18、24、37のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換された配列をコードするDNAを得るには、多くの方法を用いることができる。例えば、点変異又は欠失変異を生じさせるために遺伝子を変異源処理する方法；遺伝子を選択的に開裂し、次に選択されたヌクレオチドを除去又は付加し、そして遺伝子を連結する方法；オリゴヌクレオチド変異誘発法等が挙げられる。

上記の方法により得られる本発明のGnT-IVをコードするDNAを適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを作製し、それを宿主細胞に導入し、得られた細胞を培養することにより本発明のGnT-IVを製造することができる。用いられるベクターDNAは、プラスミドDNAでもバクテリオファージDNAでもよい。例えば、後記実施例に示されるベクターpSVLベクター(Pharmacia, Sweden)を用いることができる。得られた組み換え体DNAを導入する宿主細胞としては、原核細胞、動物細胞、酵母、カビ、昆虫細胞など、組換えDNA技術で用いられる細胞ならば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、原核細胞としては大腸菌、動物細胞としてはチャイニーズハムスターの細胞であるCHO細胞、サル細胞であるCOS細胞等が挙げられる。

上記の形質転換は、それぞれの宿主について一般的に行われている方法で行う。例としては、宿主が大腸菌ならばカルシウム法その他の方法により作成したコ

ンピータント細胞に組み換えDNAを含むベクターを温度ショック法あるいはエレクトロポレーション法により導入する。宿主が酵母であればリチウム法その他の方法により作成したコンピータント細胞に組み換えDNAを含むベクターを温度ショック法あるいはエレクトロポレーション法により導入する。宿主が動物細胞であれば、増殖期等の細胞に組み換えDNAを含むベクターをリン酸カルシウム法、リポフェクション法またはエレクトロポレーション法により導入する。

このようにして得られた形質転換体を培地に培養することにより、GnT-IVタンパク質を産生させる。

形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては、それぞれの宿主が生育可能な培地ならば良い。例としては、宿主が大腸菌ならばLB培地などを用いる。宿主が酵母であればYPD培地などを用いる。宿主が動物細胞であれば、Dulbecco's MEMに動物血清を加えたものなどを用いる。培養は、それぞれの宿主について一般的に用いられている条件で行う。例としては、宿主が大腸菌ならば約30～37℃で、約3～24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることができる。宿主が酵母であれば約25～37℃で、約12時間～2週間行い、必要により通気や攪拌を加えることができる。宿主が動物細胞であれば約32～37℃で、5% CO₂、100%湿度の条件で約24時間～2週間行い、必要により気相の条件を変えたり攪拌を加えることができる。

培養後、培養菌体あるいは細胞をホモジェナイザー、フレンチプレス、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解によって菌体または細胞を破壊し、菌体外にGnT-IVタンパク質を溶出させ、可溶性の画分から該タンパク質を得ることができる。また、目的のタンパク質が不溶性画分に含まれる場合は菌体または細胞を破壊後、遠心分離により不溶性画分を回収し、塩酸グアニジンなどを含む緩衝液などによって可溶性にして回収する方法も用いる。このほか塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤を含む緩衝液によって直接菌体あるいは細胞を破壊し、菌体外に目的のタンパク質を溶出させる方法もある。

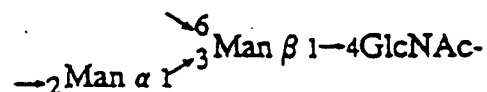
上記上澄み液からGnT-IVタンパク質を精製するには、実施例1に示した方法の他に、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離、精製法としては、遠心分離、塩析、溶媒沈殿、透析、限外濾過、分配

クロマトグラフィー、ゲル濾過、キャピラリー電気泳動、TLC、イオン交換クロマトグラフィー、金属キレートクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、等電点電気泳動などがある。

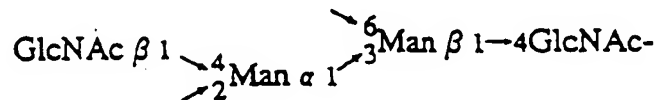
上記のようにしてウシ小腸より得られたGnT-IV酵素タンパク質の生化学的性質は、以下の通りである。

(1) 作用

糖供与体としてUDP-GlcNAcを、糖受容体として下記式：



で表される部分構造を有する糖質をそれぞれ基質とし、下記式：



で表される部分構造を有する糖質を生成する。

糖受容体となる糖質は、オリゴ糖、多糖、複合糖質（糖ペプチド、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカン）およびそれらの誘導体をいう。

(2) 基質特異性

受容体となる糖質がオリゴ糖（オリゴ糖の構造については第4図参照）の場合、GnT-II product型オリゴ糖を受容体としたときを100%とすると、コア型オリゴ糖、GnT-I product型オリゴ糖、GnT-V product型オリゴ糖に対して、それぞれ0%、54%、164%の反応性を示す。

GnT-II product型オリゴ糖の還元末端GlcNAcにフコースが $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で結合した構造には46%の反応性を示す。

GnT-II product型のMannose $\alpha 1 \rightarrow 3$ 分岐側のGlcNAcを欠いた構造には、0%の反応性を示す。

GnT-II product型オリゴ糖の $\alpha 1 \rightarrow 6$ 分岐側GlcNAcにGalactoseが $\beta 1 \rightarrow 4$ 結

合で結合した構造には16%の反応性、 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 分岐側GlcNAcにGalactoseが $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合で結合した構造には0%の反応性を示す。

GnT-II product型オリゴ糖の $\beta 1 \rightarrow 4$ 残基にGlcNAcが $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合で結合した構造には0%の反応性を示す。

(3) 分子量

SDS-PAGE（非還元下）で約66K。peptide N-glycosidase F 処理後約60K。peptide N-glycanase でバンドの移動があることから、糖タンパク質と考えられる。

TritonX-100 入りのゲル濾過でのみかけの分子量は77K。従ってGnT-IVはサブユニット構造を持たず、モノマーで機能していると考えられる。

塩基配列から推定された本酵素のタンパク質部分は535アミノ酸残基から成り、分子量は61614である。

(4) 至適pH

反応の至適pHは約5.5である。pH6.5～8.0の範囲で最大値の50%以上の活性が認められる。

(5) 阻害、活性化及び安定化

(i) 阻害

本酵素は20mMのEDTAの添加で活性が阻止される。

本酵素はUDP誘導体によって阻害される。阻害の強さはUDP≫UDP-Glc>UDP-GalNAc≫2'-deoxy UDP>UDP-hexanolamine≫UDP-Gal>UTP>UDP-glucuronic acid>UMP である。

uridine, TDP, CDP には阻害効果がない。

(ii) 活性化

活性発現に2価カチオンが必須である。2価カチオンの中では、 Mn^{2+} が最大の効果を示し、7.5mM濃度下 Co^{2+} 、 Mg^{2+} では Mn^{2+} の70%程度、 Ca^{2+} では同じく10%程度の効果がある。 Mn^{2+} の効果は5～20mMの範囲で最大である。

(iii) 安定化

BSA, glycerol に安定化効果が認められる。

(6) 速度定数

受容体となる糖質がオリゴ糖（オリゴ糖の構造については第4図参照）の場合、(i) 0.8mM の受容体基質、20mM UDP-GlcNAc, 7.5mM MnCl₂, 200mM GlcNAc, 0.5%(w/v) Triton X-100, 10% glycerol, 1% BSAを含む125mM MOPSバッファー, pH7.3, 50μl 中で37°C, 4時間反応させてAssay する条件:

GnT-II product型オリゴ糖に対する K_m , V_{max} 値は、それぞれ、 0.73mM , $3.23\text{ }\mu\text{M/min}$ 。

GnT-V 型 product オリゴ糖に対する K_m , V_{max} 値は、それぞれ、0.13mM, 1.75 μ M/min。

GnT-II型product オリゴ糖を受容体基質にした場合、UDP-GlcNAcに対する K_m 値は0.22mM。

(ii) 120mM UDP-GlcNAc, 7.5nM $MnCl_2$, 0.5%(w/v) TritonX-100, 10% glycerol, 1% BSAを含む、125mM MOPS バッファー, pH 7.3, 37°C, 4時間反応させてAssay する条件:

GnT-II product型オリゴ糖に対する K_m , V_{max} 値は、それぞれ、0.59mM, 0.74mM/min/mg。

GnT-V product 型オリゴ糖に対するKm, Vmax値は、それぞれ、0.14mM, 0.47mM /min/mg。

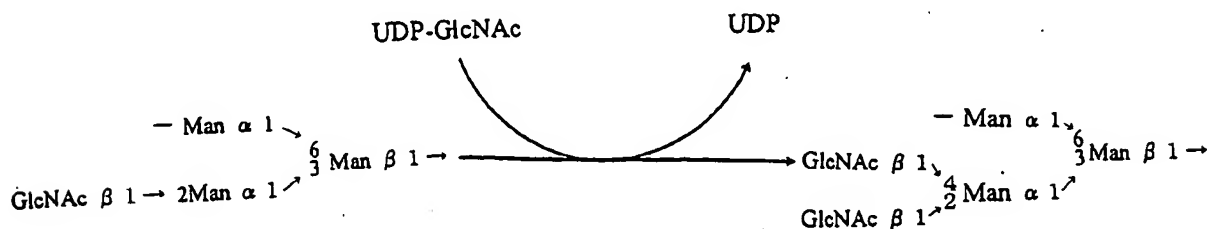
(7) GnT-IVファミリー

ウシGnT-IVa とヒトGnT-IVa の両者のホモロジーは核酸レベルで91%、アミノ酸レベルで96%である。

ウシ小腸から得られた精製GnT-IVの部分アミノ酸構造は、すべてウシGnT-IVa遺伝子中にコードされている。

ヒトGnT-IVb とヒトGnT-IVa とは核酸レベルで63%、アミノ酸レベルで62%のホモロジーがあるが、C末端およびN末端領域が全く異なっている。

以上の生化学的性質より、本発明のGnT-IVは、従来の糖転移酵素では行うことのできなかつた下式の反応を行いうる点において、新規酵素と認定した。



図面の簡単な説明

第1図は、Asn 結合型糖鎖生合成経路を示す。

第2図は、Asn 結合型糖鎖のバリエーション（竹内 誠；和光純薬時報 64, 18-19, 1996；図1より改変）を示す。

- a. マンナン型：酵母・カビなど菌類に特徴的な糖鎖構造
- b. キシロースハイマンノース型：植物・軟体動物・昆虫に特徴的
- c. ハイマンノース型：植物・昆虫から動物まで共通してみられる構造
- d. ハイブリッド型：昆虫・動物に共通してみられる構造
- e. コンプレックス型：動物に特徴的
- f. 原核細胞：Asn 結合型糖鎖の生合成系が無い

図中、点線で囲った部分は共通コア糖鎖を示す。

第3図は、GlcNAc転移酵素（GlcNAc糖転移酵素）作用点を示す。

第4図は、オリゴ糖の呼称とその構造と示す。

第5図は、GnT-IV反応生成物の高速液体クロマトグラムを示す。

第6図は、Q-Sepharose FFクロマトグラフィーの分析結果を示す。

第7図は、銅キレートSepharose FFクロマトグラフィーの分析結果を示す。

第8図は、UDP-Hexanolamine Agaroseアフィニティークロマトグラフィー(I)の分析結果を示す。

第9図は、UDP-Hexanolamine Agaroseアフィニティークロマトグラフィー(II)の分析結果を示す。

第10図は、Superdex 200ゲルクロマトグラフィーの分析結果を示す。

第11図は、精製GnT-IVのSDS-PAGE（SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動）の結果を示す写真である。

第12図は、GnT-IV標品のNativeゲル電気泳動写真と活性を示す。

第13図は、GnT-IV, V, VI product オリゴ糖のスミス分解を示す。

第14図は、GnT-IV反応プロダクトの¹H-NMR（30℃）の結果を示す。

第15図は、GnT-IVの至適pHを示す。

第16図は、GnT-IVの至適Mn²⁺濃度を示す。

第17図は、糖タンパク質に対してGnT-IVの作用させた反応産物のSDS-PAGE（S

D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動) 及びそのフルオロクロマトグラフによる分析結果を示す写真である (A : C B B によるタンパク質染色、B : フルオログラフィー)。

Lane 1, 2 ; アシアロ・アガラクト・ヒト・トランスフェリン 7.6 μ g

Lane 3 ; アシアロ・ヒト・トランスフェリン 7.6 μ g

Lane 4, 5 ; アシアロ・アガラクト・CHO 細胞由来組換え体・ヒト・エリスロポエチン 2.8 μ g

Lane 6, 7 ; アシアロ・アガラクト・フェツイン 1.3 μ g

Lane 1, 4, 6 は、GnT-IV を加えずに反応させた MOCK 実験。M は分子量マーカー (Bio-Rad)、PM はプレステインされた分子量マーカー (Bio-Rad, USA)

GnT-IV 反応条件: 0.702 nmol/hr の GnT-IV、バイアンテナリー型糖鎖 1.6 nmol 相当の基質糖タンパク質 (フェツインだけは、糖鎖含量を 1.6 nmol に合わせた)、450 nCi の UDP-[14C]GlcNAc を含む溶液 10 μ l に等量の assay mixture (250 mM MOPS buffer, pH 7.3, 400 mM GlcNAc, 20% glycerol, 1.0% (w/v) Triton X-100, 15 mM MnCl₂, 1 mM UDP-GlcNAc) を加えた反応液を 37 °C で 20 時間 incubate した後、1/10 量を SDS-PAGE 及びフルオログラフィーで分析した。

SDS-PAGE には、10-20% グラジェントゲル (第一化学) を使い、フルオログラフィーには、Amplity (アマシャム) を使い、X 線フィルムに 20 時間露光した。糖タンパク質中のバイアンテナリー型糖鎖の測定は、PVDF 膜にドットプロットした後、ConA-HRP と POD-イムノステインキット (和光純薬) を用いて行った。

第18図は、ヒト GnT-IVa のオープンリーディングフレームと pCore-His 発現ベクターに含まれる領域を示す。

第19図は、各細胞株が生産するエリスロポエチンの等電点電気泳動/ウェスタン解析を示す。2 種類のエリスロポエチン生産株、およびそれらにウシあるいはヒトの GnT-IVa 遺伝子を導入した株について、それらが分泌するエリスロポエチンを等電点電気泳動および抗エリスロポエチン抗体を用いたウェスタン法により解析した。左端に同時に泳動した pI マーカーの位置を示す。

発明を実施するための最良の方法

以下に本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されることはない。

〔参考例 1〕

(1) 実施例に用いた試薬類

特に指定の無い試薬類は、和光純薬製の最高グレードのものを使用した。

① ピリジルアミノ化オリゴ糖

使用した各ピリジルアミノ化オリゴ糖は、ヒト・トランスフェリン（アポ型，Sigma, USA）[Tokugawa らの方法；Biehuizen, M.F., Mattei, M.G. and Fukuda, M. (1993) Genes Dev., 7, 468-478] で調製したものをベースとして、これに、*Arethrobacter ureafaciens* 由来 sialidase（ナカライテスク），*Aspergillus* sp. 由来 β -galactosidase（東洋紡績），ナタ豆由来 β -N-acetylhexosaminidase（生化学工業），CHO-K1 細胞抽出液（CHO-K1細胞を2倍容量の2mM MgCl₂ と1mM PMSFを含む5mM Tris-HCl, pH7.5 のバッファー中にて超音波粉碎し、900 ×g 10分間の遠心分離で得られた上清）中のGnT-V 活性画分、およびウシ小腸ホモジネート可溶化画分（調製法は、実施例 1；ミクロソーム画分の調製および可溶化に記述）中のGnT-V 活性画分を単独もしくは組み合わせて作用させて調製した。一部のものは、PA-Sugar chain 021, 022（宝酒造）を上記の酵素で処理して調製した。いずれも、ODSカラム（10×250mm, Vydac, USA）の逆相クロマトグラフィーで精製してから用いた。

② 糖タンパク質基質

ウシ・フェツイン（Sigma, USA）とCHO 細胞由来組換え体ヒト・エリスロポエチン（キリンビール）は以下の前処理により比較的均質な糖鎖構造のものを精製して用いた。糖タンパク質40～100mg を1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 0.15M NaClを含む10mM Tris-HCl, pH7.4, バッファーで平衡化したConA-Sepharoseカラム（5ml, Pharmacia, Sweden）に添加し、バイアンテナ型糖鎖の少ない glycoformを非吸着画分に得た。さらに、カラムを1.0M α -メチルマンノシド（ナカライテスク）入りの上記バッファーで溶出し、バイアンテナ型糖鎖含量の高い glycoform吸着画分を得た。こうしてバイアンテナ型糖鎖低含量のフェツインとバイアンテナ型糖

鎖高含量のエリスロポエチンを得た。なお、ヒト・トランスフェリンは、ほぼすべての糖鎖がバイアンテナリー型なので精製の必要はない。

上記のようにして得られたフェツインおよびヒト・トランスフェリンは、4mM $MgCl_2$ を含む0.4M Sodium acetate バッファー、pH5.0、1ml反応液中でシアリダーゼ1Uと β -ガラクトシダーゼ0 または107Uを37°C、16時間反応させ、アシアロ化及びアシアロ・アガラクト化した。また、バイアンテナ型糖鎖高含量のエリスロポエチンはシアリダーゼ0.5Uと β -galactosidase 5U を上記と同様に作用させて、アシアロ・ガラクト化した。

得られた糖タンパク質基質は50mM Ammonium acetate バッファー、pH7.3 に対して透析した後、BCA protein assay (Pierce, USA) で、タンパク質量を定量 (BSA, bovine serum albumin を標準物質とした) し、SDS-PAGE (sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)にて検定して実施例に用いた。

③ RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

RT-PCRにはAccess RT-PCR System (Promega, USA) を、さらに目的の遺伝子断片を増幅する際にはPfu polymerase (Stratagene, USA)を用いた。

(2) 実施例に用いた機器類

① 遺伝子配列決定

ABI PLISM 377 DNA Sequencer(Perkin-Elmer, USA)を使用した。

〔参考例2〕 GnT-IV活性の特異的アッセイ

一般的にGnT活性のアッセイ法としてはオリゴ糖基質への放射活性ラベル化GlcNAcの転移を測定する方法、予めラベルされたオリゴ糖基質へのGlcNAcの転移をHPLC等で分別測定する方法がある。谷口らは、GnT-II product型オリゴ糖を受容体に用い、GnT-III, -IV及び-V 活性を同時測定する方法を開発している [Nishikawa, A., Fujii, S., Sugiyama, T. and Taniguchi, N. (1988) Anal. Biochem., 170, 349-354]。しかしながら、全体内におけるGnT-IVの相対活性がGnT-II I やV に比べて低いことから、上記アッセイ法はそのままではGnT-IVの精製には不向きであった。

そこで発明者らは、アッセイに用いる受容体ピリジルアミノ化オリゴ糖量をGn

T-III, -V のアッセイ時の10倍にすることで、GnT-IVを定量的にかつ感度良く測定する方法を開発した [Tokugawa, K., Oguri, S. and Takeuchi, M. (1996) Glycoconjugate J., 13, 53-56]。そのような大量の受容体オリゴ糖を調製することは一般に大変困難であるが、徳川らの方法 [Tokugawa, K., Oguri, S. and Takeuchi, M. (1996) Glycoconjugate J., 13, 53-56] により容易に調製できる。

そこで、本発明の実施例においては、以下のようにしてGnT-IVのアッセイを行った。

0.8mM のピリジルアミノ化オリゴ糖基質 (GnT-II product型オリゴ糖基質), 20mM UDP-GlcNAc, 7.5mM MnCl₂, 200mM GlcNAc, 0.5%(w/v) Triton X-100, 10% glycerol, 1%BSA を含む125mM MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid] バッファー, pH7.3, 37 °Cの反応液中で酵素を4時間反応させ、2分間煮沸して反応を止めた。0.45nm孔のフィルターで固形物を除いた後、5 μ l をとってTSK ODS-80TMカラム (4.6 \times 150mm, TOSO)で分析した (第5図)。カラム条件は、流速1.2 ml/min、カラム温度50°Cとした。液相は、0.15%(w/v) n-ブタノールを含む50mM酢酸アンモニウムバッファー、pH4.0とした。ピリジルアミノ基のケイ光は、Excitation 320nm, Emission 400nmで測定した。

〔実施例1〕 酵素の単離・精製

(1) 酵素源のスクリーニング

前述のアッセイ法を用いてGnT-IVを精製するための酵素源を探した。第1表に示すようにウシ小腸でGnT-IVの相対活性がGnT-III, -Vに比べて高いことが分かり、これを精製の出発材料に選んだ。

第1表
G n T - I V 酵素源の探索

酵素源		比活性 (pmol/h · mg-protein)		
		IV	III	V
培養細胞	CHO	10.8	0	1097
	Bowes	12.0	341	150
	AH66 ¹⁾	2.0	634	30
	Solid AH ¹⁾	27	116	80
	Yoshida sarcoma ¹⁾	1.3	70	109
ラット臓器 ¹⁾	小腸	17	280	68
	心臓	9.4	11	10
	脾臓	20	100	21
	腎臓	1.9	1840	30
	脳	3.7	660	38
ヒト ¹⁾ ウシ臓器	肝臓	2.8	8.1	8.2
	小腸	25	174	41
	心臓	N. D.	N. D.	N. D.
	脾臓	10.9	0.7	10.9
初乳		N. D.	N. D.	N. D.

N. D. ; 検出限界以下

¹⁾ ; Nishikawa, A. et al., BBA 1035, 313-318 (1990)より

(2) 精製

特に記載がないかぎり、操作は全て4℃で行なった。

① ミクロソーム画分の調製

2Kgのウシ小腸（畜肉加工業者より入手）をミンチにし、4倍容量の抽出バッファー（0.25M Sucrose, 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1mM benzamidine hydrochloride, 1mM dithiothreitol, 10mg/ml antipain を含む10mM Tris-HCl buffer, pH7.4）を加え、ポリトロン（Kinematica, Sweden）でホモゲナイズした。それを900 × gで10分間遠心分離し、上清をさらに105,000 × gで60分間遠心分離し、ミクロソーム画分を沈殿として得た（標品1）。

② 可溶化

標品1を3倍容量の上記抽出バッファーに終濃度1%のTriton-100を加えたもの（可溶化バッファーと呼ぶ）に懸濁し、同様の操作を繰り返して、上清を可溶化画分に加えた（標品2）。

③ Q-Sepharose FF クロマトグラフィー

予め、操作バッファー 1（1mM Benzamidine hydrochloride, 0.1% Triton

X-100, 20% glycerol を含む20mM Tris-HCl, pH7.4) で平衡化したQ-Sepharose FFカラム(5×30cm, Pharmacia, Sweden)に標品2をアプライし、0~0.5MのKClグラジェントで溶出した(第6図)(標品3)。

④ 銅キレートSepharose FF クロマトグラフィー

予め、操作バッファー2(操作バッファー1に終濃度0.15MのKClを添加した組成のもの)で平衡化した銅キレートSepharose FFカラム(5×10cm, Pharmacia, Sweden)に標品3をアプライし、5倍量の操作バッファー2で非吸着画分を洗い流した後、0.01M Glycineのグラジェントで溶出した(第7図)。得られたGnT-IV活性画分をプールし、YM30限外濾過膜(Amicon, USA)で濃縮した(標品4)。

⑤ UDP-Hexanolamine Agarose アフィニティークロマトグラフィーI

予め、操作バッファー3(0.15M KCl, 10mM MnCl₂, 0.05% Triton X-100, 20% glycerol を含む20mM Tris-HCl, pH8.0)で平衡化したUDP-Hexanolamine Agaroseアフィニティークラム(1.2 × 4.5cm, Sigma, USA)に予め1mM benzamidine hydrochlorideを添加した操作バッファー3に対して透析した標品4の半量を1回分としてアプライし、操作バッファー4(10mM MnCl₂, 0.05% Triton X-100, 20% glycerolを含む20mM Tris-HCl, pH8.0)で非吸着画分を洗い流した後、終濃度1MのKClを加えた操作バッファー4で溶出した(第8図)。GnT-IV活性画分をプールし、操作バッファー5(操作バッファー4と同じ組成でpHが7.4)に対して透析した(標品5)。

⑥ UDP-Hexanolamine Agarose アフィニティークロマトグラフィーII

予め操作バッファー5で平衡化したUDP-Hexanolamine Agarose アフィニティークラム(1.0 × 6.5cm, Sigma, USA)に標品5をアプライし、操作バッファー5で非吸着画分を洗い流した後、MnCl₂を除去した操作バッファー5で溶出した(第9図)。得られたGnT-IV活性画分をプールした(標品6)。

⑦ Superdex 200ゲルクロマトグラフィー

標品を小さなQ-SepharoseFFカラムで濃縮し、予め操作バッファー6(操作バッファー5に終濃度0.15M KClを添加した組成のもの)で平衡化したSuperdex 200HR5/5(1 × 30cm, Pharmacia, Sweden)にアプライした(第10図)。0.25ml

/min の流速で操作バッファー6を流し続け、GnT-IV活性画分を得た（標品7）。

⑧ 各精製ステップにおけるタンパク量、活性、比活性の動きを第2表にまとめた。最終標品は、小腸ホモジネート中の224,000倍の純度まで精製された。

第2表

GnT-IV 精製表

精製段階	タンパク量 (mg)	全酵素活性 (nmol/h)	比活性 (nmol/h/mg)	収率 (%)	精製ファクター (-fold)
ウシ小腸ホモジネート	112,900	49,500	0.44	100	1
可溶化画分	24,100	14,500	0.60	29	1.4
Qセファロース	4,000	7,200	1.80	14	4.1
Cu キレートセファロース	450	3,670	8.10	7.4	18.4
UDP-ヘキサノルアミン I	0.59	1,950	3,310	3.9	7,510
UDP-ヘキサノルアミン II	0.035	1,420	40,600	2.9	92,200
スーパーデックス 200	0.008	790	98,800	1.6	224,000

ウシ小腸 2 K g からスタート

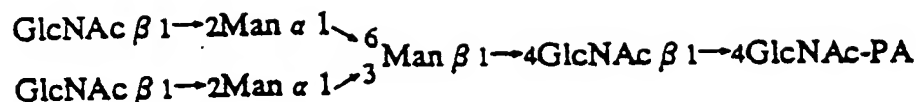
(3) 酵素化学及びタンパク質化学的性質

① 純度

標品7はSDS-PAGEで分子量60Kの位置に単一のバンドを与えた（第11図）。標品7をNative-PAGEにかけ、ゲルを切り取ってGnT-IV活性を測定したところ、タンパク質のバンドと活性の位置とが一致した（第12図）。さらに、標品7にはGnT-I, II, III及びVの活性は全く検出されなかった。以上のことから標品7はGnT-IVの純品であると結論した。なお、Triton X-100入りのゲル濾過で得られたみかけの分子量が77Kであった（第10図）ことと考え合わせると、GnT-IVはサブユニット構造を持たず、シングルユニットで活性を発現していると考えられる。標品7をPeptide N-glycosidase F(Boehringer-Mannheim, Germany)で処理すると、SDS-PAGE上で易動度の増大が見られたことからウシ小腸のGnT-IVは少なくともAsn結合型糖鎖を持った糖タンパク質であると考えられる。

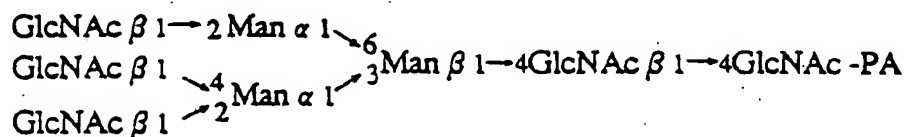
② 反応特異性

本酵素は、下式：

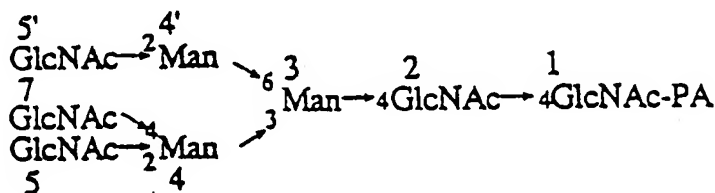


で示される GnT-II product 型オリゴ糖を基質として標準アッセイ条件で反応させると、HPLCで単一の生産物（ピリジルアミノ化オリゴ糖1）を与えた。

これを集め、(i) スミス分解と Laser TOF-MS（レーザーイオン化型質量分析計）の組み合わせ、及び(ii) $^1\text{H-NMR}$ で構造を決定し、本酵素の反応特異性を調べた。ピリジルアミノ化オリゴ糖1を Kobata, Takasaki らの方法 [Kobata, A. and Takasaki, S. (1993) in Glycobiology "A Practical Approach" (Fukuda, M. and Kobata, A., eds) 165-185, IRL press, Oxford, England] に従ってスミス分解すると、第1回目のスミス分解で質量数は1599.0から795.30に変化し、第2回目のスミス分解でさらに634.68へ変化した。これは、第13図のような反応経路に一致しており、本酵素の反応生産物が以下の構造であることが決定された。



さらにピリジルアミノ化オリゴ糖1を $^1\text{H-NMR}$ にかけたところ、下式の GlcNAc7 のアノメリックプロトンに相当する4.53ppm のピークが検出され、さらにそのカップリング定数 $J_{1,2}$ 値が7.9Hzであったことから（第14図）、下式のように GlcNAc が Man4 の4位に β -型で結合していることが示され上記の構造決定を完全に支持した。



③ 至適 pH

本酵素の至適pHは第15図に示したように7.5付近であった。

④ 2価カチオン要求性

第3表に示したように、本酵素はEDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) の添加で失活し、活性発現には2価カチオンが必須である。その効果は Mn^{2+} が最大で Co^{2+} , Mg^{2+} がそれに次ぎ、 Ca^{2+} , Fe^{2+} にも弱い効果が認められた。 Mn^{2+} の濃度は10mM付近が至適であった(第16図)。

第3表

GnT-IV の2価カチオン要求性

添加物	活性 (%)
なし	5.6
EDTA	0
MnCl_2	100
CoCl_2	74.8
MgCl_2	72.5
CaCl_2	7.2
FeCl_2	9.8
CuCl_2	0

金属イオンを除去した GnT-IV 標品に10mMの各種金属イオンを添加してGnT-IV 活性を測定した。10mM MnCl_2 添加の時の GnT-IV 活性を100%として表示した。

⑤ 糖ヌクレオチドによる阻害

第4表に示したようにUDPが最も強く本酵素の活性を阻害した。UDP-glucose, UDP-GalNAc, 2'-deoxy-UDP, UDP-hexanolamine (Sigma, USA)がこの順にUDPに次ぐ阻害効果を示した。Uridine, UMP, TDP, CDP にはほとんど阻害効果が見られなかった。

第4表
ヌクレオチドによる GnT-IV の阻害

添加物	活性 (%)
なし	100
uridine	115
UMP	97.3
UDP	27.3
UTP	88.2
TDP	110
CDP	112
2'-deoxy-UDP	67.4
UDP-hexanolamine	73.6
UDP-glucose	56.6
UDP-galactose	87.3
UDP-glucuronic acid	92.3
UDP-N-acetylgalactosamine	59.7

0.5mM UDP-GlcNAc 存在下で2mM の各種ヌクレオチドを添加した時の GnT-IV 活性を、何も添加しない時の値を100%として表示した。

⑥ 基質特異性

第5表に示したように、本酵素は受容体としてGnT-V product 型（第5表, E）を最も好み、次いでGnT-II product型（第5表, D）を好んだ。

また、GnT-II product型オリゴ糖を受容体としたときを100%とすると、コア型オリゴ糖（第5表, A）、GnT-I product型オリゴ糖（第5表, C）に対して、それぞれ0%、54%の反応性を示す。

GnT-II product型オリゴ糖の還元末端GlcNAcにフコースが $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で結合した構造（第5表, F）には46%の反応性を示す。

GnT-II product型のMannose $\alpha 1 \rightarrow 3$ 分岐側のGlcNAcを欠いた構造（第5表, B）には、0%の反応性を示す。

GnT-II product型オリゴ糖の $\alpha 1 \rightarrow 6$ 分岐側GlcNAcにGalactoseが $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合で結合した構造（第5表, G）には16%の反応性、 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 分岐側GlcNAcにGalactoseが $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合で結合した構造（第5表, H、I）には 0%の反応性を示す。

GnT-II product型オリゴ糖のMannose $\beta 1 \rightarrow 4$ 残基にGlcNAcが $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合で結合した構造（第5表, J）には 0%の反応性を示す。

以上のような本酵素の基質特異性は、Schachterら [Glesson, P. A. and Scha

chter, H. (1983) J. Biol. Chem., 258, 6162-6173] によって予言されたGnT-IVの基質特異性とほぼ一致し、本酵素がComplex型糖鎖生合成上永らくMissing linkとなっていたGnT-IVであることが明らかとなった。

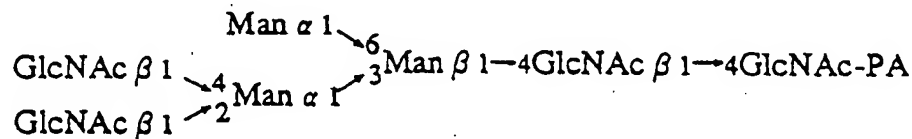
第5表

	受容体オリゴ糖	GlcNAc 転移相対活性 (%)
A	$\begin{array}{c} \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc-PA}$	0
B	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc-PA}$	0
C	$\begin{array}{c} \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc-PA}$	54
D	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc-PA}$	100
E	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 6 \\ \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \rightarrow 6 \\ \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \rightarrow 3 \end{array} \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc-PA}$	164
F	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc-PA}$ $\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha 1' \\ \downarrow 6 \end{array}$	46
G	$\begin{array}{c} \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc-PA}$	16
H	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc-PA}$	0
I	$\begin{array}{c} \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc-PA}$	0
J	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc-PA} \\ \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3 \end{array}$	0

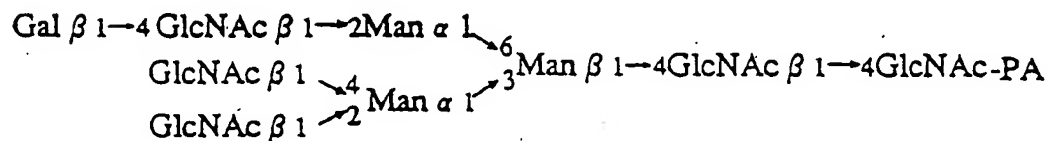
⑦ 速度定数

参考例 2 の Assay 条件における本酵素の K_m , V_{max} 値は、GnT-11 product 型オリゴ糖に対してそれぞれ 0.73mM, 3.23 μ M/min ; GnT-V product 型に対してそれぞれ 0.13mM, 1.75 μ M/min であった。UDP-GlcNAc に対する K_m 値は 0.22mM であった。

得られたピリジルアミノ化オリゴ糖のうち下記式のものは新規なオリゴ糖であった。



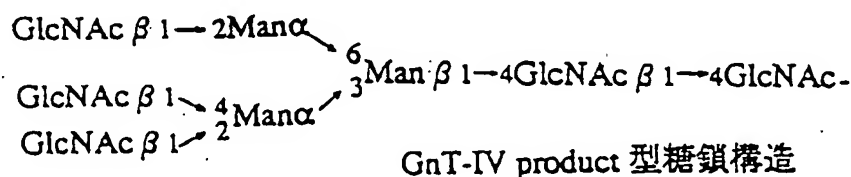
および



⑧ 糖タンパク質への作用

GnT-IV がオリゴ糖基質だけでなく、糖タンパク質上のオリゴ糖鎖にも作用できることを示すため、UDP-[14 C] GlcNAc を糖供与体としてアシアロ・アガラクト化した各糖タンパク質に GnT-IV を作用させ、反応産物を SDS-PAGE 及びそのフルオログラフィーで解析した (第 17 図、A, B)。第 17 図、B のレーン 2 と 5 に示したように、アシアロ・アガラクト・ヒト・トランスフェリン及び・アシアロ・アガラクト・CHO 細胞由来組換え体・ヒト・エリスロポエチンに対し、[14 C]-GlcNAc の転移が確認された。

なお、この GnT-IV 反応で得られた GnT-IV product 型糖鎖 (下記式) :



を持つヒト・トランスフェリンは天然には存在しない新規な物質である。

〔実施例 2〕 ペプチドマッピング分析

最終精製した本酵素約1mgをLaemmliの方法[Laemmli, U. K. Nature (1970)313, 756-762]により0.1%SDS, 10%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。分離されたタンパク質をPVDF膜(ABI社、USA)にエレクトロブロットし、PVDF膜上に固定されたタンパク質をS-カルボキシメチル化した後、最初にリジルエンドペプチダーゼ(和光純薬) Achromobacter protease I(AP-I)で消化してAP-I消化断片混合液を、AP-I消化後のPVDF膜をさらにAsp-N(宝酒造)で消化し、Asp-N消化断片混合液を得た。各ペプチド断片を高速液体クロマトグラフィーで分離し、そのアミノ酸配列を決定したところ、配列番号1～14に記載の配列を得た。

〔実施例 3〕 ウシ GnT-IVa cDNA の単離および同定

(1) RT-PCR

実施例 2 で得られた配列番号 7 で表されるアミノ酸配列をもとに、配列番号 15 で表されるオリゴマー AP-5F を、また配列番号 11 で表されるアミノ酸配列をもとに、配列番号 16 で表されるオリゴマー DN-9R を合成した。guanidium isothiocyanate 法によりウシ小腸組織から抽出した total RNA を鋳型とし、上記のプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、特異的と思われる約 170bp の増幅断片が得られたので、これをサブクローンした。

(2) ライブラリーのスクリーニング

上述の RT-PCR 産物を用いてウシ小腸 cDNA ライブラリー (Clontech, USA) をスクリーニングしたところ、4 つのポジティブブランクが得られた。これらの塩基配列を決定したところ、中には実施例 2 に示した部分アミノ酸配列 (配列番号 1 ～ 14) をコードする塩基配列が多数出現し、終始コドンと思われる配列が含まれていた。得られた塩基配列の最も上流域に当たる部分 150bp を用いて、さらに同ライブラリーをスクリーニングし、2 つのポジティブブランクを得た。これらの塩基配列を決定し、同様に最上流域 150bp をプローブとして同ライブラリーをスクリーニングしたが、新たなクローンは得られなかった。

(3) 5' RACE(Rapid amplification of cDNA ends)

完全長の cDNA を得るために、次に 5' RACE を行った。ファージスクリーニングで得られた最上流域の配列を用いて、1 回目の 5' RACE を行ったが、まだ開始コドンが見いだされなかったので、1 回目の 5' RACE で得られた配列をもとに 2 回目の 5' RACE を行い、開始コドンを含む配列を得た。先に得られていたファージクローンの部分遺伝子配列と連結し、完全なオープンリーディングフレーム（遺伝子 1）を含む遺伝子断片を得た。以上のように得られた DNA 断片の塩基配列を配列番号 17、また推定されるアミノ酸配列を配列番号 18 に示す。この DNA 断片は実施例 2 で得られた 14 のアミノ酸配列（配列番号 1 ～ 14）をコードする塩基配列を全て含むことが確認された。

〔実施例 4〕 クローニングしたウシ GnT-IVa 遺伝子を用いた発現ベクターの作製と GnT-IVa 酵素の製造法

(1) ベクターの構築

遺伝子 1 の開始コドンの上流に XhoI 部位導入するようなプライマー（配列番号 19）と、終始コドンの下流に XbaI 部位を導入するようなプライマー（配列番号 20）を合成し、GnT-IV 酵素をコードする遺伝子全部を PCR 法により増幅した。この増幅断片を XhoI および XbaI で消化して、pSVL ベクター（Pharmacia, Sweden）の XhoI-XbaI 間に挿入して、プラスミド pBGT4 を作成した。

(2) COS7 細胞への導入

プラスミド pBGT4 をエレクトロポレーション法で COS7 細胞（理研細胞バンク）に導入した。即ち、0.8ml の PBS(-)（日水製薬）中の約 5×10^6 個の細胞に 10 μ g のプラスミドを加え、ジーンパルサー（BioRad, USA）を使用して室温において 1600V、25 μ F の条件で遺伝子導入した。細胞は 90mm のシャーレに移し、10ml の 10% のウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's 培地（Base Catalogue No. 12430, Life Technologies, Inc., USA）で、5%CO₂ 存在下、37℃ で 72 時間培養し、細胞を回収して、100 μ l の緩衝液（5mM Tris-HCl pH7.5, 2mM MgCl₂, 1mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride）に懸濁して、ソニケーターで破碎後、2000×g で 5 分間遠心し、細胞抽出液を得た。

(3) GnT-IV活性のアッセイ

参考例 2 で述べた方法により、細胞抽出液中のGnT-IV活性を測定した。測定結果を第 6 表に示す。コントロールとして、pSVLベクターを導入した細胞の抽出液に比べ、プラスミドpBGT4 を導入した細胞の抽出液は、細胞あたり44～78倍以上のGnT-IV活性を持っていた。以上の結果より、遺伝子 1 がGnT-IV酵素をコードしていることが確認され、この方法により培養細胞でGnT-IV酵素を製造することができた。

第 6 表

プラスミド	比活性 (pmol/hr/mg protein)	活性の割合
pSVL	409	1
pBGT4(#1)	29623	72
pBGT4(#2)	31773	78
pBGT4(#3)	20182	44

反応時間：4 時間

活性の割合はすべてpSVL の総活性を1 として示した。

〔実施例 5〕 ヒトGnT-IVa cDNAの単離および同定

(1) RT-PCR

実施例 3 で得られたウシGnT-IVa の塩基配列を参考に、配列番号21で表されるプライマーh1-2Fを、また配列番号22で表されるプライマーh1-1Rを合成した。ヒト肝臓由来total RNA (Clontech, USA)を鋳型とし、上記のプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ、特異的と思われる約650bpの増幅断片が得られたので、これをサブクローニングして塩基配列を解析した。

(2) ライブラリーのスクリーニング

上述のRT-PCRによって得られた685bpのDNA断片をプローブとし、ヒト肝臓由来cDNAライブラリー (Clontech, USA)をスクリーニングしたところ、2個のポジティブブランクhGT4/ λ gt10-1及びhGT4/ λ gt10-2が得られた。これらファージクローンの挿入断片の塩基配列を解析したところ、hGT4/ λ gt10-1には804bp、hGT4/ λ gt10-2には2115bpのDNA領域が含まれており、前者の領域は全て後者に含まれていた。配列番号23に示したように、hGT4/ λ gt10-2に含まれるDNA断片にはウシGnT-IVa のアミノ酸配列と96%一致する高い相同性のオープンリーディングフレーム (ORF) が認められた。このORFは、次の実施例6に記載する結果からヒトGnT-IVa 遺伝子であることが確認され、そのアミノ酸配列を配列番号24に示した。

〔実施例6〕 ヒトGnT-IVa 遺伝子の発現プラスミドの作製とヒトGnT-IVa 酵素の製造法

(1) ヒトGnT-IVa 遺伝子の発現プラスミドpHGT4-1の構築

ヒトGnT-IVa 遺伝子の開始コドンの上流にXhoI部位を導入するようなプライマー (h1-7F、配列番号25) と、終始コドンの下流のプライマー (h1-7R、配列番号26) を合成し、ヒト肝臓由来RNA (Clontech, USA)を鋳型として、ヒトGnT-IVa 酵素をコードする遺伝子全部をRT-PCR法により増幅した。この増幅断片はプラスミドpCRScript Amp SK(+) (Stratagene, USA)のSrfI部位にlacZ遺伝子の転写方向と逆向きに挿入し、得られたプラスミドを用いて増幅された断片が配列番号24のアミノ酸配列をコードしていることを塩基配列解析によって確認した。さらに、このプラスミドをXhoIおよびSacIで消化して得られたXhoI-SacI 1.7kb断片を、pSVLベクター (Pharmacia, Sweden)のXhoI-SacI間に挿入してヒトGnT-IVa 遺伝子の発現プラスミドpHGT4-1を構築した。

(2) ヒトGnT-IVa 遺伝子のCOS7細胞への導入

プラスミドpHGT4-1をエレクトロポレーション法によりCOS7細胞に導入し、10%CO₂存在下、37℃で72時間培養し、細胞を回収して、100 μ lの緩衝液 (5mM Tris-HCl pH7.5, 2mM 塩化マグネシウム, 1mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride) に懸濁して、超音波破碎機で破碎後、2000xgで5分間遠心し、細胞抽出液を得

た。

(3) ヒトGnT-IVa 遺伝子のCOS7細胞における発現

参考例2で述べた方法により、細胞抽出液中のGnT-IV活性を測定した。測定結果を第7表に示す。コントロールとしてpSVLベクターを導入した細胞集団の抽出液に比べ、pHGT4-1を組み込んだ細胞集団の抽出液は、細胞あたり21~28倍以上のGnT-IV活性をもっていた。この結果より、配列番号23に示したGnT-IVa 遺伝子は糖転移酵素GnT-IVをコードしていることが確認され、この方法により培養細胞でヒトGnT-IVa を製造することが可能であることも確かめられた。

第7表

プラスミド	比活性 (pmol/hr/mg protein)	活性の割合
pSVL	1037	1
pHGT4-1(#1)	28951	28
pHGT4-1(#2)	21788	21
pHGT4-2(#1)	11024	11
pHGT4-2(#2)	8029	8

反応時間：1.3 時間

活性の割合はすべてpSVL の総活性を1 として示した。

〔実施例7〕 ヒトGnT-IVb cDNA の単離および同定

(1) PCR、RT-PCR、5'-RACE(Rapid amplification of cDNA ends)によるヒトGnT-IVa 遺伝子に類似する遺伝子の取得：

実施例3で得られたヒトGnT-IVa の塩基配列と類似性のある塩基配列をBLASTNによってDNAデータベースGenBankで検索した結果、Accession Number R12057、H10557、W16571が見い出された。そこで、配列番号27で表されるプライマーh2

-45Fと配列番号28で表されるプライマーh2-43Rを合成し、Quick Screen Human cDNA library panel(Clontech, USA)のヒト脳由来cDNA libraryを鋳型としてPCR法により増幅し、これをpCRScript Amp SK(+)(Stratagene, USA)のSrfI部位にサブクローニングして塩基配列を解析した。また、配列番号29で表されるプライマーh2-2Fと配列番号30で表されるプライマーh2-1Rを合成し、ヒト肺由来total RNA (Clontech, USA)を鋳型としてRT-PCRを行った。その結果、予想と一致する約500bpの増幅断片が得られたので、これをpCRScript Amp SK(+)(Stratagene, USA)のSrfI部位にサブクローニングして塩基配列を解析した。

得られた2個のDNA断片の塩基配列から、両者はオーバーラップしており、その1006bpの領域にはウシ及びヒトのGnT-IVaのアミノ酸配列と高い類似性の1個のオープンリーディングフレーム(ORF)が認められ、GnT-IVaに関連するタンパク質の存在が示唆された。

そこで、Accession Number R12057の上流とW16571の下流の可能性のある塩基配列をBLASTNによってDNAデータベースGenBankで再度検索した結果、R12057の上流としてR15554、W16571の下流としてW16466が見い出された。しかし、これらの塩基配列から推定されるORFには不適当と思われる終始コドンが含まれるため、塩基配列を確認するためにRT-PCRによるDNA断片の取得を行なった。プライマーとしては、配列番号31で表されるh2-1F、配列番号32で表されるh2-3F、配列番号33で表されるh2-8Rを合成した。h2-1Fと実施例5記載のh1-1Rの組み合わせ、あるいはh2-3Fとh2-8Rの組み合わせで、ヒト肝臓由来total RNA(Clontech, USA)を鋳型としてRT-PCRを行ったところ、各々予想と一致する約550bpの増幅断片、約300bpの増幅断片が検出された。これらをそれぞれpCRScript Amp SK(+)(Stratagene, USA)のSrfI部位にサブクローニングして塩基配列を解析した結果、上記のh2-45Fとh2-1R間の1006bpの上流と下流にオーバーラップするDNA断片であることが確認された。そして、連結した1361bpの領域にはウシ及びヒトのGnT-IVaのアミノ酸配列と高い類似性をもつ433個のアミノ酸からなる1個のORFが認められた。

しかし、GnT-IVaアミノ酸配列と比較すると、開始メチオニンは更に上流に存在すると推定されたため、5'-RACEによる上流領域の取得を行なった。5'-RACE

はHuman Lung 5'-RACE-Ready cDNA (Clontech, USA)を使用し、1回目のPCRにはプライマーとしてAncor Primerと配列番号34で表されるh2-5R、2回目のPCRにはプライマーとしてAncor Primerと配列番号35で表されるh2-3Rを使用した。5'-RACEで得られたDNA断片は精製し、EcoRIおよびPstIで消化後、アガロースゲル電気泳動を用いて分離し、約450bp付近の断片を回収した。このDNA断片を、pUC18ベクター (Pharmacia, Sweden)のEcoRI-PstI間に挿入して塩基配列を解析した結果、上記のh2-1Fからh2-8Rの領域の上流にオーバーラップするDNA断片であることが確認された。そして、連結した1758bpの領域にはウシ及びヒトのGnT-IVa のアミノ酸配列と高い類似性をもつ548個のアミノ酸からなる1個のORFが確認された。このORF領域の塩基配列を配列番号36に、そのアミノ酸配列を配列番号37に示した。この遺伝子は、次の実施例8に記載する結果からヒトGnT-IVb 遺伝子であることが確認された。

〔実施例8〕 ヒトGnT-IVb 遺伝子の発現プラスミドの作製とヒトGnT-IVb 酵素の製造法

(1) ヒトGnT-IVb 遺伝子の発現プラスミドpHGT4-2の構築

ヒトGnT-IVb 遺伝子の開始コドンの上流にXhoI部位導入するようなプライマー(h2-4: 配列番号38)と、終始コドンの下流にXbaI部位を導入するようにプライマー(h2-10R: 配列番号39)を合成し、ヒト肺由来RNA (Clontech, USA)を鋳型として、ヒトGnT-IV酵素をコードする遺伝子全部をRT-PCR法により増幅した。この増幅断片はプラスミドpCRScript Amp SK(+) (Stratagene, USA)のSrfI部位に挿入し、得られたプラスミドを用いて増幅された断片が配列番号37のアミノ酸配列をコードしていることを塩基配列解析によって確認した。さらに、このプラスミドをXhoIおよびXbaIで消化して得られたXhoI-XbaI 1.7kb断片を、pSVLベクター (Pharmacia, Sweden)のXhoI-XbaI間に挿入してヒトGnT-IVb 遺伝子の発現プラスミドpHGT4-2を構築した。

(2) ヒトGnT-IVb 遺伝子のCOS7細胞への導入

プラスミドpHGT4-2をエレクトロポレーション法によりCOS7細胞に導入し、10%CO₂存在下、37℃で72時間培養し、細胞を回収して、100μlの緩衝液(5mM

Tris-HCl pH7.5, 2mM 塩化マグネシウム, 1mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride) に懸濁して、超音波破碎機で破碎後、2000xgで5分間遠心し、細胞抽出液を得た。

(3) ヒトGnT-IVb 遺伝子のCOS7細胞における発現

参考例2で述べた方法により、細胞抽出液中のGnT-IV活性を測定した。測定結果を第7表に示す。コントロールとしてpSVLベクターを導入した細胞集団の抽出液に比べ、pHGT4-2を組み込んだpSVLベクターを導入した細胞集団の抽出液は、細胞あたり8～11倍以上のGnT-IV活性をもっていた。この結果より、配列番号36に示したGnT-IVb 遺伝子は糖転移酵素GnT-IVをコードしていることが確認され、この方法により培養細胞でヒトGnT-IVb を製造することが可能であることも確かめられた。

〔実施例9〕 ウシGnT-IVa遺伝子のN末端欠失変異体発現プラスミドの作製とその発現

(1) ウシGnT-IVa遺伝子の発現プラスミドpSigIle93、pSigPro113およびpSigPro142の構築

ヒトエリスロポイエチン (GenBank Accession Number X02157) のシグナル配列の上流にXhoI部位導入するようなプライマー (XhoEsig:配列番号40) とシグナル配列のC末端とウシGnT-IVaアミノ酸配列中の93番目のIle以降を連結するようなアンチセンスプライマー (E4-1R:配列番号41) を合成し、ヒトエリスロポイエチンのシグナル配列をPCR法により増幅した。また、上記のアンチセンスプライマーに対応するセンスプライマー (E4-1F:配列番号42) と終始コドンの下流にXbaI部位を導入するようなプライマー (4EXPR:配列番号20) を合成し、ウシGnT-IVa遺伝子を鋳型として、部分配列をPCR法により増幅した。得られた2種類のPCR産物の一部を鋳型として、XhoEsig、4EXPR両プライマーを用いてPCRを行い、増幅断片をXhoIとXbaIで消化して、pSVLベクター (Pharmacia, Sweden) のXhoI-XbaI間に挿入し、ヒトエリスロポイエチンシグナルとウシGnT-IVaアミノ酸配列中の93番目のIle以降が連結したアミノ酸配列を発現するプラスミドpSigIle93を構築した。

E4-1Rプライマーの代わりにE4-2Rプライマー（配列番号43）あるいはE4-3Rプライマー（配列番号44）、E4-1Fプライマーの代わりにE4-2Fプライマー（配列番号45）あるいはE4-3Fプライマー（配列番号46）を用いて、上記と同じ操作を繰り返し、ヒトエリスロポイエチンシグナルとウシGnT-IVaアミノ酸配列中の113番目のPro以降が連結したアミノ酸配列を発現するプラスミドpSigPro113、あるいはヒトエリスロポイエチンシグナルとウシGnT-IVaアミノ酸配列中の142番目のPro以降が連結したアミノ酸配列を発現するプラスミドpSigPro142をそれぞれ構築した。

(2) ウシGnT-IVa遺伝子のN末端欠失変異体遺伝子のCOS7細胞への導入

プラスミドpSig11e93、pSigPro113あるいはpSigPro142をエレクトロポレーション法によりCOS7細胞に導入し、10%CO₂存在下、37℃で72時間培養したのち、細胞と培養上清を別々に回収した。細胞は100 μ lの緩衝液（5mM Tris-HCl pH7.5, 2mM 塩化マグネシウム, 1mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride）に懸濁して、超音波破碎機で破碎後、2000×gで5分間遠心し、細胞抽出液を得た。培養上清はセントリプラス30（アミコン）で約100 μ lになるまで濃縮した。

(3) ウシGnT-IVa遺伝子のN末端欠失変異体遺伝子のCOS7細胞における発現

参考例2で述べた方法により、細胞培養上清および細胞抽出液中のGnT-IV活性を測定した。測定結果を第8表に示す。ポジティブコントロールとしてpBGT4ベクターを導入した細胞の総活性（細胞中+細胞培養上清中）に比べ、pSig11e93プラスミドを導入した細胞では30%以上のGnT-IV活性をもっていた。また、そのうちの1/3以上の活性は細胞培養上清中に分泌されていた。この結果より、ウシGnT-IVaアミノ酸配列中のN末端より92番目のアミノ酸までは、活性を保持したまま欠失させることができた。また、適当な分泌シグナルを用いれば、GnT-IVa酵素を分泌発現させることも可能であることが示された。

第 8 表

プラスミド	画分	活性(pmol/hr)	各画分中の	総活性の割合
			活性の割合 (%)	(%)
pSVL	上清	136	0.5	1.9
pSVL	細胞	384	1.4	
pBGT4	上清	722	2.7	100.0
pBGT4	細胞	26152	97.3	
pSigIle93	上清	3106	11.6	31.9
pSigIle93	細胞	5471	20.4	
pSigPro113	上清	312	1.2	3.4
pSigPro113	細胞	606	2.3	
pSigPro142	上清	219	0.8	2.2
pSigPro142	細胞	381	1.4	

反応時間：2.5時間

活性の割合はすべてpBGT4の総活性を100%として示した。

〔実施例 10〕 ウシGnT-IVa遺伝子のC末端欠失変異体発現プラスミドの作製とその発現

(1) ウシGnT-IVa遺伝子の発現プラスミドpCGly499, pCPro465, pCLys432およびpCPro383の構築

ウシGnT-IVa遺伝子の開始コドンの上流にXhoI部位を導入するようなプライマー（配列番号19）と、499番目のGlyコドンの次に終始コドンをつなぐプライマー（CGly499:配列番号47）を合成し、ウシGnT-IVa遺伝子の部分配列をPCR法により増幅した。この増幅断片をXhoIおよびXbaIで消化して、pSVLベクター（Pharmacia, Sweden）のXhoI-XbaI間に挿入した。

入して、ウシGnT-IVaアミノ酸配列を499番のグリシンまで発現するプラスミド pCGly499を作成した。CGly499プライマーの代わりにCPro465プライマー（配列番号48）、CLys432プライマー（配列番号49）あるいはCPro383プライマー（配列番号50）を用い、同様にプラスミドを構築し、pCPro465（ウシGnT-IVaアミノ酸配列を465番のプロリンまで発現するプラスミド）、pCLys432（ウシGnT-IVaアミノ酸配列を432番のリジンまで発現するプラスミド）あるいはpCPro383（ウシGnT-IVaアミノ酸配列を383番のプロリンまで発現するプラスミド）とそれぞれ名付けた。

(2) ウシGnT-IVa遺伝子のC末端欠失変異体遺伝子のCOS7細胞への導入

プラスミドpCGly499, pCPro465, pCLys432あるいはpCPro383をエレクトロポレーション法によりCOS7細胞に導入し、10%CO₂存在下、37℃で72時間培養し、細胞を回収して、100μlの緩衝液（5mM Tris-HCl pH7.5, 2mM 塩化マグネシウム, 1mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride）に懸濁して、超音波破碎機で破碎後、200×g で5分間遠心し、細胞抽出液を得た。

(3) ウシGnT-IVa遺伝子のC末端欠失変異体遺伝子のCOS7細胞における発現

参考例2で述べた方法により、細胞抽出液中のGnT-IV活性を測定した。測定結果を第9表に示す。ポジティブコントロールとしてpBGT4ベクターを導入した細胞集団の抽出液に比べ、pCGly499, pCPro465, pCLys432あるいはpCPro383を導入した細胞集団の抽出液は、細胞あたりの15.2%, 12.1%, 2.8% あるいは104.2%のGnT-IV活性をそれぞれもっていた。この結果より、ウシGnT-IVaアミノ酸配列のN末端より384アミノ酸以降のアミノ酸配列を欠失させても、GnT-IV活性を保持できることが示された。

第9表

プラスミド	比活性 (pmol/hr/mg protein)	活性の割合 (%)
pSVL	77	1
pBGT4	14917	100
pCGly499	2263	15
pCPro465	1798	12
pCLys432	410	3
pCPro383	15551	104

反応時間：2時間

活性の割合はすべてpBGT4の総活性を100%として示した。

〔実施例11〕 各GnT-IV遺伝子の大腸菌用発現プラスミドの作製とその発現

(1) ウシGnT-IVa遺伝子の大腸菌用発現プラスミドの作製

ウシGnT-IVa遺伝子の開始コドンの上流にBspHI部位を導入するようなプライマー (BSP-N: 配列番号51) と、終始コドンの下流にHindIII部位を導入するようなプライマー (C-Hd: 配列番号52) を合成し、ウシGnT-IVa遺伝子のオープンリーディングフレームをPCR法により増幅した。この増幅断片をBspHIおよびHindIIIで消化して、pTrc99Aベクター (Pharmacia, Sweden) のNcoI-HindIII間に挿入して、プラスミドpEBGT4を作成した。BSP-Nプライマーの代わりにBSP-sNプライマー (配列番号53) をC-Hdプライマーと共にPCRに使用し、同様にプラスミドpE11e93を構築した。また、BSP-NプライマーとウシGnT-IVa遺伝子のC末端のアミノ酸の下流にHis-Tag、終始コドンおよびHindIII部位を導入するプライマー (CH-Hd: 配列番号54) とHis-Tag、終始コドンおよびHindIII部位を持つプライマー (H-Hd: 配列番号55) を用いて、C末端にHis-Tagが付加されたオープンリーディングフレームをコードする遺伝子を増幅し、同様にpEBGT4+Hisを構築

した。

(2) ヒトGnT-IVaおよびGnT-IVb遺伝子の大腸菌用発現プラスミドの作製

ヒトGnT-IVaアミノ酸配列94番目のLeuの上流に開始コドンとIleコドンをさらに上流にはBspHI部位を導入するようなプライマー（4aBSPIL94：配列番号56）とC末端のアミノ酸の下流にHis-Tag、終始コドンおよびHindIII部位を導入するプライマー（4aCH-Hd:配列番号57）と、H-Hdプライマーを合成し、ヒトGnT-IVa遺伝子の部分配列にHis-Tagをコードする配列を付加した遺伝子断片を増幅した。この増幅断片をBspHIとHindIIIで消化して、pTrc99Aベクター（Pharmacia, Sweden）のNcoI-HindIII間に挿入して、プラスミドpMA4a+Hisを作成した。さらに4aCH-Hdプライマーの代わりに、CP383H-Hdプライマー（配列番号58）を使用し、同様にプラスミドpCore+Hisを構築した（第18図）。ヒトGnT-IVb遺伝子の開始コドンの上流にBspHI部位を導入するようなプライマー（4bBSP-N:配列番号59）と4bSACRプライマー（配列番号60）で増幅したヒトGnT-IVb遺伝子断片をBspHIとSacIで消化してpTrc99Aベクター（Pharmacia, Sweden）のNcoI-SacI間に挿入した。このプラスミドのSacI-HindIII間に、4bSACFプライマー（配列番号61）とヒトGnT-IVbアミノ酸配列のC末端にHis-Tagを導入するプライマー（4bCH-Hd：配列番号62）およびH-Hdプライマーを用いて増幅してSacIとHindIIIで消化したヒトGnT-IVb遺伝子の部分長を挿入し、プラスミドpEHGT4-2+Hisを完成した。さらにヒトGnT-IVbアミノ酸配列91番目のGlyの上流にNcoI部位と開始コドンを導入するようなプライマー（4bNCOG91: 配列番号63）と4bCH-Hdプライマー、H-Hdプライマーを用いてヒトGnT-IVb遺伝子の部分配列を増幅し、NcoIとHindIIIで消化してpTrc99Aベクター（Pharmacia, Sweden）のNcoI-HindIII間に挿入し、プラスミドpMA4b+Hisを作成した。

(3) 各発現プラスミドの大腸菌BL21株への導入

各プラスミドをカルシウム法により調製した大腸菌BL21株のコンピテントセルに導入し、アンピシリン100 μ g/mlを含むLB寒天培地上で増殖させた。各プラスミドが導入された大腸菌のコロニーを液体培地に植菌して、37°Cで一晩浸透培養した後、2%濃度になるように新鮮なLB液体培地に植菌した。培養液の濁度(OD 595nm)がおおよそ0.1から0.2の間にIPTG(Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside)

side)を最終濃度 1 mMになるように添加し、37℃ 2 時間あるいは25℃ 4 時間培養して、500 μ l 分の菌体を回収した。菌体ペレットを50 μ l の緩衝液 (5mM Tris-HCl pH7.5, 2mM 塩化マグネシウム, 1mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride) に懸濁して、超音波破碎機で破碎後、2000 \times g で5分間遠心し、細胞抽出液を得た。

(4) 各発現プラスミドの大腸菌BL21株における発現

参考例2で述べた方法により、細胞抽出液中のGnT-IV活性を測定した。ウシ遺伝子の発現の測定結果を第10表に示す。コントロールとしてpTrc99Aベクターを導入した大腸菌菌体の抽出液はほとんどGnT-IV活性を持たなかったが、pEBGT4を導入した大腸菌の抽出液は、明らかなGnT-IV活性をもっていた。このことから、GnT-IV酵素は大腸菌でも生産可能であることが示された。ウシGnT-IVaのC末端に付加したヒスチジンのTag配列はGnT-IV活性には大きく影響せず、GnT-IV酵素には適当なTag配列を付加できることが示された。また、N末端の92アミノ酸を欠失させた変異体 (pE11e93) ではさらに強いGnT-IV活性を示し、動物細胞で確かめられたGnT-IV酵素の変異体の発現が大腸菌においても可能であることが示された。

第10表

プラスミド	活性 (pmol/hr/mg protein)	活性の割合 (%)
pTrc99A	0	0
pEBGT4	4611	100
pEBGT4+His	3090	67
pE11e93	5841	127

反応時間 : 3.0時間

IPTG添加後37℃ 2 時間培養

活性の割合はすべてpEBGT4 の総活性を100%として示した。

また、ヒト遺伝子の発現の測定結果を第11表に示す。コントロールとしてpTrc99Aベクターを導入した大腸菌菌体の抽出液に比べ、いずれのプラスミドも有意にGnT-IV活性を持っていた。ヒトGnT-IVa酵素、ヒトGnT-IVb酵素においてもウシGnT-IVa酵素で示されたN末端の欠失と同様に、活性を保持したままN末端を欠失させることが可能であった。また、ヒトGnT-IVa酵素においてはN末端の欠失と同時に、C末端の欠失を起こさせても、高いGnT-IV活性をもっていた(pCore+His)。このことにより、この欠失変異で除かれた部分はGnT-IV活性には不可欠ではないことが示された。

第11表

プラスミド	活性 (pmol/hr/mg protein)	活性の割合 (%)
pTrc99A	0	0
pEBGT4+His	21390	637
pMA4a+His	3359	100
pCore+His	39766	1184
pEHGT4-2+His	270	8
pMA4b+His	2812	84

反応時間：4.0時間

IPTG添加後25℃ 4時間培養

活性の割合はすべてpMA4a+His の総活性を100%として示した。

〔実施例12〕 ウシあるいはヒトGnT-IVa遺伝子をEPO産生CHO細胞に導入することによる組換え体エリスロポエチン(EPO)の糖鎖分岐構造の変換

(1) EPO 産生CHO細胞株へのGnT-IV発現プラスミドの導入

特許公報平2-17156に示された方法により、EPO産生CHO細胞株を作製した。それらの細胞株M01とH-5にGnT-IVa発現プラスミドpBGT4あるいはpHGT4-1をエレクトロポレーション法により導入した。導入の際には、GnT-IVa発現プラスミドを15 μ g と薬剤耐性マーカープラスミド(pSV2bsr[科研製薬]あるいはpMAMneo[Clontech])を1.5 μ g を混合したものを使用した。遺伝子を導入した細胞は、10%CO₂存在下、37°Cで約60時間培養したのち、ブラストサイジンS[科研製薬]（最終濃度10 μ g/ml）あるいはGeneticin[Life Technologies., Inc.]（最終濃度500 μ g/ml）を培地に添加し、さらに10日から2週間培養を続け、薬剤耐性株を複数単離した。

(2) EPO 産生CHO細胞株における導入GnT-IV遺伝子発現の確認

EPO 産生CHO細胞株（元株）および各薬剤耐性株を適当なスケールで培養し、total RNAを精製してGnT-IVa遺伝子の一部をプローブとしたRNAドットプロット解析を行い、GnT-IVaのmRNA量を調べた。また、参考例2に示したアッセイ法を用い、元株および各薬剤耐性株が発現するGnT-IV活性を測定した。RNAドットプロット解析により強いシグナルを与え、かつ元株に比べて高いGnT-IV活性を示す株を選び、EPOの生産に使用した。選択した細胞株は、例えば、M01(ウシGnT-IV)#36株ではM01株に対して約104倍の、またH-5(ヒトGnT-IV)#23株ではH-5株に対して約125 倍のGnT-IV活性上昇を示していた。

(3) GnT-IV遺伝子を導入したEPO産生CHO細胞株を使用したEPOの生産

EPOは培養液中に分泌発現される。そこで、EPO産生CHO細胞株M01およびH-5と、上記のM01(ウシGnT-IV)#36株およびH-5(ヒトGnT-IV)#23株について、ローラボトルによる培養を行った。まず、各細胞株を増殖用培地中で付着培養させ、 1.5×10^7 個の細胞を200mlの増殖用培地を入れた850cm²のローラボトルに移し、10%CO₂存在下、37°Cで3日間細胞が均一に付着するように培養した。その後、増殖用培地を除き、PBS緩衝液で細胞を洗った後、200mlの無血清培地を加え、さらに10%CO₂存在下、37°Cで7日間培養後、その培養上清を回収した。増殖用培地としてはD-MEM/F12混合培地に5%胎児牛血清、290mg/l L-グルタミン酸、1xMEM非必須アミノ酸溶液、100nMメソトレキセートを加えたものを使用し、無血清培地としては上記の培地より胎児牛血清を除いたものを使用した。それぞれ

の無血清培養上清中に含まれるEPOは、抗ヒトEPO抗体を用いたELISA法によって定量した。

(4) GnT-IV遺伝子導入株、非導入株が生産するEPOの糖鎖構造に基づく分析

組換え体EPOは、等電点電気泳動上では単一の分子としては存在せず、様々な電荷を持つ分子の集合体である。タンパク質の部分には変化がないので、これらの分子の電荷の違いは糖鎖構造の違いに基づくものであることが示されており、これらの分子集合体はグリコフォームと呼ばれている [Watson, E. and Yao, F., Anal. Biochem. (1993), 210, 389-93]。EPOにはアスパラギン結合型糖鎖が3本ついており、それぞれの糖鎖の分岐構造は2本(biantennary)から4本(tetra-antennary)まで様々である。各々の分岐GlcNAcの先にはさらにGal (ガラクトース) が結合し、さらにその先にシアル酸が結合する。したがって、GnT-IV遺伝子の導入により糖鎖の分岐が高進すると結合するシアル酸数の増加を招き、等電点の低いグリコフォームの含量が増加するはずである。そこで、等電点電気泳動による分析を行い、GnT-IV遺伝子を導入したEPO産生細胞について生産されるEPOの糖鎖構造の変化を検出した。

等電点電気泳動にはファルマシア社製のMultiphor II装置を使用した。泳動には5%のアクリルアミド(30:0.8)、1.5%のPharmalyte 2.5-5 (ファルマシア)の組成のゲルを用い、+電極液には0.1M硫酸、-電極液には0.2M L-ヒスチジン溶液を使用した。等電点電気泳動後のサンプルは、PVDF膜へ電気泳動的にトランスファーし、抗EPOマウスモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析を行い、EPOの各グリコフォームのバンドを検出した。各細胞株の無血清培養上清はセントリプラス30およびマイクロコン30 (いずれもアミコン) を用いて、必要に応じて約7~1000倍に濃縮した。当初、およそ50~100 IU分のEPOをサンプルとして用いたが、ウェスタンブロット解析により検出されるバンドの強度がほぼ同等になるように、適宜サンプル量を調節した。

その結果、M01株由来のEPOとM01(ウシGnT-IV)#36株由来のEPOを比較すると、主たるEPOグリコフォームの位置が少なくとも1つ分、低pI側(+電極液側)へシフトしていることが確認された(第19図)。この結果より、導入発現されたGnT-IV酵素がEPOに結合したアスパラギン結合型糖鎖のGlcNAc分岐数を増加させ

、その結果シアル酸の結合数が増えて等電点の低いグリコフォームの含量が増加したものと考えられた。また、同様の解析をH-5株とH-5(ヒトGnT-IV)#23株について行ったところ、やはり主たるBP0グリコフォームの位置が低pI側へシフトしていた(第19図)。

以上より、任意の細胞にGnT-IV遺伝子を導入することにより、その細胞が生産するタンパク質のアスパラギン結合型糖鎖の構造を改変しうることが示された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、新規な β 1 \rightarrow 4 N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(GnT-IV)及びその製造方法、ならびに該酵素をコードする遺伝子が提供される。本発明のGnT-IVによると、既知の糖転移酵素では形成できなかった分岐構造の複合糖質を生産することが可能となり、複合糖質型の医薬品、試薬、食品の製造や改良に役立つとともに、あらゆる生体高分子の糖鎖構造の改変に有用である。

また、本発明のGnT-IV遺伝子は、癌などの病変の診断や治療、微生物等を利用した複合糖質製品の糖鎖構造の改変に有用である。

さらに、本発明のGnT-IVタンパク質を抗原として得られる抗体・抗血清、あるいは本発明のGnT-IV遺伝子の全部または一部をプローブに用いれば、微生物・培養細胞・動物各組織・血球・血液のキャラクタライズや癌など病変細胞組織の診断等に有用である。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Asp Asn Leu Tyr Pro Glu Glu Lys

5

配列番号 : 2

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Asp Tyr Val Asn Gly Val Val Ala Asn Glu Lys

5

10

配列番号 : 3

配列の長さ : 21

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Glu Ile Ser Ser Gly Leu Val Glu Ile Ile Ser Pro Pro Glu Ser Tyr

46

5 10 15
Tyr Pro Asp Leu Thr
20

配列番号 : 4

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Glu Arg Val Arg Trp Arg Thr Lys
5

配列番号 : 5

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Gln Asn Leu Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr Ala Gln Glu
5 10 15

配列番号 : 6

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Asp His Ile Leu Trp Val

5

配列番号 : 7

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Ile His Val Asn Pro Pro Ala Glu Val Ser Thr Ser Leu

5

10

配列番号 : 8

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Val Tyr Gln Gly His Thr Leu Glu Lys

5

10

配列番号 : 9

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Phe Phe Trp Ala Ile Thr Pro Val Ala

5

10

配列番号：10

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Tyr Ile Leu Phe Lys

5

配列番号：11

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Lys Pro Val Asn Val Glu Ser Tyr Leu Phe His Ser Gly Asn

5

10

配列番号：12

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Ile Leu Leu X Thr Thr Val Glu Val

5

10

配列番号：1 3

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Ser Glu Gly Leu Asp Ile Ser Lys

5

配列番号：1 4

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Gly Tyr Phe Arg Ile Gly Lys

5

配列番号：1 5

配列の長さ：2 9

5 0

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAR ATY CAY GTB AAY CCH CCH GCN GAR GT 29

Lys Ile His Val Asn Pro Pro Ala Glu Val

配列番号：16

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

TG RAA VAR RTA RSW YTC VAC RTT VAC DGG YTT RTC 35

His Phe Leu Tyr Ser Glu Val Asn Val Pro Lys Asp

配列番号：17

配列の長さ：2246

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GGCGGCTGCT CGGTGGCGGC TCGTCGGCGG CCGCGGCAGG ACTGGCAGCG CCGGCGGCGG 60
 GGAGAAAGAA GCATCCACCT ATGAAGACCG TGCAGACAGT CCTGAATAAT AATTGTGAAT 120
 GGTGTGGCTG CCAGACTAGT TCTGCTGAGC ATCTGAAATG AACCTCTCCT ATTGATTGTT 180
 TCAGTTGGCC CCCAGCCAGG AGTACTGGGT TTGCTTGA CTAGGATAAA AAGAAACGGA 240
 CTTGGTTATC ATCGTAAACA TATGAACCAG TGTGATGGTG AAATGAG ATG AGG CTC 296

Met Arg Leu

1

CGA AAT GGA ACT GTA GCC ACT GTT TTA GCA TTT ATC ACC TCG TTC CTC 344
 Arg Asn Gly Thr Val Ala Thr Val Leu Ala Phe Ile Thr Ser Phe Leu

5

10

15

ACT TTA TCT TGG TAT ACA ACA TGG CAA AAT GGG AAA GAA AAA GTG ATT 392
 Thr Leu Ser Trp Tyr Thr Thr Trp Gln Asn Gly Lys Glu Lys Val Ile

20

25

30

35

GCT TAT CAA CGA GAA TTT CTT GCT CTG AAA GAA CGT CTC CGA ATA GCT 440
 Ala Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu Lys Glu Arg Leu Arg Ile Ala

40

45

50

GAA CAT CGA ATC TCT CAG CGC TCT TCT GAG CTC AGT GCC ATT GTA CAG 488
 Glu His Arg Ile Ser Gln Arg Ser Ser Glu Leu Ser Ala Ile Val Gln

55

60

65

CAA TTC AAG CGT GTA GAA GCA GAA ACA AAC AGG AGT AAG GAT CCA GTG 536
 Gln Phe Lys Arg Val Glu Ala Glu Thr Asn Arg Ser Lys Asp Pro Val

70

75

80

AAT AAA TTT TCA GAT GAT ACC CTA AAG ATA CTA AAG GAG TTA ACA AGC 584
 Asn Lys Phe Ser Asp Asp Thr Leu Lys Ile Leu Lys Glu Leu Thr Ser

85

90

95

AAA AAG TCT CTT CAA GTG CCA AGT ATT TAT TAT CAT TTG CCT CAT TTA 632
 Lys Lys Ser Leu Gln Val Pro Ser Ile Tyr Tyr His Leu Pro His Leu

100

105

110

115

TTG CAA AAT GAA GGA AGC CTT CAA CCT GCC GTG CAG ATC GGA AAT GGA 680

Leu Gln Asn Glu Gly Ser Leu Gln Pro Ala Val Gln Ile Gly Asn Gly
 120 125 130
 CGA ACA GGA GTT TCA ATA GTA ATG GGA ATT CCT ACA GTG AAG AGA GAA 728
 Arg Thr Gly Val Ser Ile Val Met Gly Ile Pro Thr Val Lys Arg Glu
 135 140 145
 GTT AAA TCT TAC CTC ATA GAA ACT CTT CAT TCC CTT ATT GAT AAT CTG 776
 Val Lys Ser Tyr Leu Ile Glu Thr Leu His Ser Leu Ile Asp Asn Leu
 150 155 160
 TAT CCT GAA GAG AAG TTG GAC TGT GTT ATA GTA GTC TTC ATA GGA GAG 824
 Tyr Pro Glu Glu Lys Leu Asp Cys Val Ile Val Val Phe Ile Gly Glu
 165 170 175
 ACA GAT ACT GAT TAT GTA AAT GGT GTT GTA GCC AAC CTG GAG AAA GAA 872
 Thr Asp Thr Asp Tyr Val Asn Gly Val Val Ala Asn Leu Glu Lys Glu
 180 185 190 195
 TTT TCT AAA GAA ATC AGT TCT GGC TTG GTG GAA ATA ATA TCA CCT CCT 920
 Phe Ser Lys Glu Ile Ser Ser Gly Leu Val Glu Ile Ile Ser Pro Pro
 200 205 210
 GAA AGC TAT TAT CCT GAC CTG ACG AAC TTA AAG GAG ACA TTT GGA GAT 968
 Glu Ser Tyr Tyr Pro Asp Leu Thr Asn Leu Lys Glu Thr Phe Gly Asp
 215 220 225
 TCT AAA GAA AGA GTA AGA TGG AGA ACA AAG CAA AAC CTA GAT TAT TGT 1016
 Ser Lys Glu Arg Val Arg Trp Arg Thr Lys Gln Asn Leu Asp Tyr Cys
 230 235 240
 TTT CTA ATG ATG TAT GCT CAG GAA AAA GGC ACA TAC TAC ATC CAG CTT 1064
 Phe Leu Met Met Tyr Ala Gln Glu Lys Gly Thr Tyr Tyr Ile Gln Leu
 245 250 255
 GAA GAT GAT ATT ATT GTC AAA CAG AAT TAC TTT AAC ACC ATA AAG AAT 1112
 Glu Asp Asp Ile Ile Val Lys Gln Asn Tyr Phe Asn Thr Ile Lys Asn
 260 265 270 275

TTT GCA CTT CAA CTT TCT TCT GAG GAA TGG ATG ATA CTT GAG TTC TCC 1160
 Phe Ala Leu Gln Leu Ser Ser Glu Glu Trp Met Ile Leu Glu Phe Ser
 280 285 290
 CAG CTG GGA TTC ATT GGT AAA ATG TTT CAA GCA CCT GAC CCA CTC CTG 1208
 Gln Leu Gly Phe Ile Gly Lys Met Phe Gln Ala Pro Asp Leu Thr Leu
 295 300 305
 ATT GTG GAA TTC ATA TTT ATG TTC TAT AAG GAG AAG CCC ATC GAC TGG 1256
 Ile Val Glu Phe Ile Phe Met Phe Tyr Lys Glu Lys Pro Ile Asp Trp
 310 315 320
 CTC TTG GAC CAT ATT CTG TGG GTC AAA GTC TGC AAC CCG GAA AAA GAT 1304
 Leu Leu Asp His Ile Leu Trp Val Lys Val Cys Asn Pro Glu Lys Asp
 325 330 335
 GCA AAA CAC TGT GAT CGA CAG AAG GCA AAT CTG CGA ATT CGT TTC AGA 1352
 Ala Lys His Cys Asp Arg Gln Lys Ala Asn Leu Arg Ile Arg Phe Arg
 340 345 350 355
 CCG TCC CTT TTC CAA CAC GTT GGT CTG CAT TCT TCA CTC ACA GGA AAA 1400
 Pro Ser Leu Phe Gln His Val Gly Leu His Ser Ser Leu Thr Gly Lys
 360 365 370
 ATT CAG AAA CTC ACG GAT AAA GAT TAC ATG AAA CCA TTA CTG CTC AAA 1448
 Ile Gln Lys Leu Thr Asp Lys Asp Tyr Met Lys Pro Leu Leu Leu Lys
 375 380 385
 ATC CAT GTA AAC CCC CCT GCA GAG GTA TCT ACT TCT TTG AAG GTC TAC 1496
 Ile His Val Asn Pro Pro Ala Glu Val Ser Thr Ser Leu Lys Val Tyr
 390 395 400
 CAA GGT CAT ACA CTG GAG AAA ACT TAC ATG GGT GAG GAC TTC TTC TGG 1544
 Gln Gly His Thr Leu Glu Lys Thr Tyr Met Gly Glu Asp Phe Phe Trp
 405 410 415
 GCT ATA ACC CCA GTA GCT GGA GAC TAC ATC CTA TTT AAA TTC GAC AAG 1592
 Ala Ile Thr Pro Val Ala Gly Asp Tyr Ile Leu Phe Lys Phe Asp Lys

420 425 430 435
 CCA GTC AAT GTG GAA AGT TAT TTG TTC CAT AGT GGC AAC CAG GAT CAT 1640
 Pro Val Asn Val Glu Ser Tyr Leu Phe His Ser Gly Asn Gln Asp His
 440 445 450
 CCA GGG GAT ATT CTG CTC AAC ACA ACG GTG GAA GTT CTG CCT TTG AAG 1688
 Pro Gly Asp Ile Leu Leu Asn Thr Thr Val Glu Val Leu Pro Leu Lys
 455 460 465
 AGT GAA GGT TTG GAC ATC AGC AAA GAA ACC AAA GAC AAA CGA TTA GAA 1736
 Ser Glu Gly Leu Asp Ile Ser Lys Glu Thr Lys Asp Lys Arg Leu Glu
 470 475 480
 GAT GGC TAT TTC AGA ATA GGG AAA TTT GAA AAC GGT GTT GCG GAA GGG 1784
 Asp Gly Tyr Phe Arg Ile Gly Lys Phe Glu Asn Gly Val Ala Glu Gly
 485 490 495
 ATG GTG GAT CCC AGC CTA AAC CCC ATT TCG GCC TTC CGA CTT TCA GTT 1832
 Met Val Asp Pro Ser Leu Asn Pro Ile Ser Ala Phe Arg Leu Ser Val 500
 500 505 510 515
 ATT CAG AAT TCT GCT GTT TGG GCC ATT CTT AAT GAG ATC CAT ATT AAA 1880
 Ile Gln Asn Ser Ala Val Trp Ala Ile Leu Asn Glu Ile His Ile Lys
 520 525 530
 AAA GTC ACA AAC TGACCATC 1900
 Lys Val Thr Asn
 535
 TCTACTAAGA AACCAACACA TTTTTCCT GTGAATTGT TGATTAAAGA CAGCTGAGCA 1960
 CGTACCTTTT TTTGGTAACT TGAATTCTAC CTCTCGCGAA ATCTACTGTA GATAAAATGA 2020
 TTGTCATATT TCCACTTGGA AAATGAATCT CCCACGGATA ATTGTATTCA TTTGAATCTA 2080
 AGCTGTCCTC CAGTTTTAAC TCAACTCAAA CGTTTTACAG TTATGACAGC CTGTTAATAT 2140
 GACTTGTAAT ATTTTGGTAT TATACTAATA CATAAGAGTT GTACATATTG TTACATTCAT 2200
 TAAATTTGAG AAAAATTAAT GTTAAATACA TTTTATGAAC GGGCCG 2246

配列番号 : 1 8

配列の長さ : 5 3 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Arg Leu Arg Asn Gly Thr Val Ala Thr Val Leu Ala Phe Ile Thr
1 5 10 15
Ser Phe Leu Thr Leu Ser Trp Tyr Thr Thr Trp Gln Asn Gly Lys Glu
20 25 30
Lys Val Ile Ala Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu Lys Glu Arg Leu
35 40 45
Arg Ile Ala Glu His Arg Ile Ser Gln Arg Ser Ser Glu Leu Ser Ala
50 55 60
Ile Val Gln Gln Phe Lys Arg Val Glu Ala Glu Thr Asn Arg Ser Lys
65 70 75 80
Asp Pro Val Asn Lys Phe Ser Asp Asp Thr Leu Lys Ile Leu Lys Glu
85 90 95
Leu Thr Ser Lys Lys Ser Leu Gln Val Pro Ser Ile Tyr Tyr His Leu
100 105 110
Pro His Leu Leu Gln Asn Glu Gly Ser Leu Gln Pro Ala Val Gln Ile
115 120 125
Gly Asn Gly Arg Thr Gly Val Ser Ile Val Met Gly Ile Pro Thr Val
130 135 140
Lys Arg Glu Val Lys Ser Tyr Leu Ile Glu Thr Leu His Ser Leu Ile
145 150 155 160
Asp Asn Leu Tyr Pro Glu Glu Lys Leu Asp Cys Val Ile Val Val Phe
165 170 175
Ile Gly Glu Thr Asp Thr Asp Tyr Val Asn Gly Val Val Ala Asn Leu

180	185	190
Glu Lys Glu Phe Ser Lys Glu Ile Ser Ser Gly Leu Val Glu Ile Ile		
195	200	205
Ser Pro Pro Glu Ser Tyr Tyr Pro Asp Leu Thr Asn Leu Lys Glu Thr		
210	215	220
Phe Gly Asp Ser Lys Glu Arg Val Arg Trp Arg Thr Lys Gln Asn Leu		
225	230	235
Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr Ala Gln Glu Lys Gly Thr Tyr Tyr		
245	250	255
Ile Gln Leu Glu Asp Asp Ile Ile Val Lys Gln Asn Tyr Phe Asn Thr		
260	265	270
Ile Lys Asn Phe Ala Leu Gln Leu Ser Ser Glu Glu Trp Met Ile Leu		
275	280	285
Glu Phe Ser Gln Leu Gly Phe Ile Gly Lys Met Phe Gln Ala Pro Asp		
290	295	300
Leu Thr Leu Ile Val Glu Phe Ile Phe Met Phe Tyr Lys Glu Lys Pro		
305	310	315
Ile Asp Trp Leu Leu Asp His Ile Leu Trp Val Lys Val Cys Asn Pro		
325	330	335
Glu Lys Asp Ala Lys His Cys Asp Arg Gln Lys Ala Asn Leu Arg Ile		
340	345	350
Arg Phe Arg Pro Ser Leu Phe Gln His Val Gly Leu His Ser Ser Leu		
355	360	365
Thr Gly Lys Ile Gln Lys Leu Thr Asp Lys Asp Tyr Met Lys Pro Leu		
370	375	380
Leu Leu Lys Ile His Val Asn Pro Pro Ala Glu Val Ser Thr Ser Leu		
385	390	395
Lys Val Tyr Gln Gly His Thr Leu Glu Lys Thr Tyr Met Gly Glu Asp		
405	410	415

Phe Phe Trp Ala Ile Thr Pro Val Ala Gly Asp Tyr Ile Leu Phe Lys
 420 425 430
 Phe Asp Lys Pro Val Asn Val Glu Ser Tyr Leu Phe His Ser Gly Asn
 435 440 445
 Gln Asp His Pro Gly Asp Ile Leu Leu Asn Thr Thr Val Glu Val Leu
 450 455 460
 Pro Leu Lys Ser Glu Gly Leu Asp Ile Ser Lys Glu Thr Lys Asp Lys
 465 470 475 480
 Arg Leu Glu Asp Gly Tyr Phe Arg Ile Gly Lys Phe Glu Asn Gly Val
 485 490 495
 Ala Glu Gly Met Val Asp Pro Ser Leu Asn Pro Ile Ser Ala Phe Arg
 500 505 510
 Leu Ser Val Ile Gln Asn Ser Ala Val Trp Ala Ile Leu Asn Glu Ile
 515 520 525
 His Ile Lys Lys Val Thr Asn
 530 535

配列番号 : 1 9

配列の長さ : 3 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

CCCTCGAG ATG AGG CTC CGA AAT GGA ACT GT 31

Met Arg Leu Arg Asn Gly Thr Val

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : Yes

配列

TTTCTAGA TCA GTT TGT GAC TTT TTT AAT AT 31

TRM Asn Thr Val Lys Lys Ile His

配列番号 : 21

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACGATTGTGC AACAGTTCAA GCGT 24

配列番号 : 22

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GGGAGAACTC CAGGATCATC CAGT 24

配列番号 : 2 3

配列の長さ : 2 1 1 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

GAAATGAACC TCTCTTATTG ATTTTATTG GCCTAGAGCC AGGAGTACTG CATTCACTTG 60
ACTTTCAGGG TAAAAAGAAA ACAGTCCTGG TTGTTGTCAT CATAAACATA TGGACCAGTG 120
TGATGGTGAA ATGAG ATG AGG CTC CGC AAT GGA ACT GTA GCC ACT GCT TTA 171

Met Arg Leu Arg Asn Gly Thr Val Ala Thr Ala Leu

1 5 10

GCA TTT ATC ACT TCC TTC CTT ACT TTG TCT TGG TAT ACT ACA TGG CAA 219
Ala Phe Ile Thr Ser Phe Leu Thr Leu Ser Trp Tyr Thr Thr Trp Gln

15 20 25

AAT GGG AAA GAA AAA CTG ATT GCT TAT CAA CGA GAA TTC CTT GCT TTG 267
Asn Gly Lys Glu Lys Leu Ile Ala Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu

30 35 40

AAA GAA CGT CTT CGA ATA GCT GAA CAC AGA ATC TCA CAG CGC TCT TCT 315
Lys Glu Arg Leu Arg Ile Ala Glu His Arg Ile Ser Gln Arg Ser Ser

45 50 55 60

GAA TTA AAT ACG ATT GTG CAA CAG TTC AAG CGT GTA GGA GCA GAA ACA 363
Glu Leu Asn Thr Ile Val Gln Gln Phe Lys Arg Val Gly Ala Glu Thr

65 70 75

AAT GGA AGT AAG GAT GCG TTG AAT AAG TTT TCA GAT AAT ACC CTA AAG 411
Asn Gly Ser Lys Asp Ala Leu Asn Lys Phe Ser Asp Asn Thr Leu Lys

80 85 90

CTG TTA AAG GAG TTA ACA AGC AAA AAA TCT CTT CAA GTG CCA AGT ATT 459
 Leu Leu Lys Glu Leu Thr Ser Lys Lys Ser Leu Gln Val Pro Ser Ile
 95 100 105
 TAT TAT CAT TTG CCT CAT TTA TTG AAA AAT GAA GGA AGT CTT CAA CCT 507
 Tyr Tyr His Leu Pro His Leu Leu Lys Asn Glu Gly Ser Leu Gln Pro
 110 115 120
 GCT GTA CAG ATT GGC AAC GGA AGA ACA GGA GTT TCA ATA GTC ATG GGC 555
 Ala Val Gln Ile Gly Asn Gly Arg Thr Gly Val Ser Ile Val Met Gly
 125 130 135 140
 ATT CCC ACA GTG AAG AGA GAA GTT AAA TCT TAC CTC ATA GAA ACT CTT 603
 Ile Pro Thr Val Lys Arg Glu Val Lys Ser Tyr Leu Ile Glu Thr Leu
 145 150 155
 CAT TCC CTT ATT GAT AAC CTG TAT CCT GAA GAG AAG TTG GAC TGT GTT 651
 His Ser Leu Ile Asp Asn Leu Tyr Pro Glu Glu Lys Leu Asp Cys Val
 160 165 170
 ATA GTA GTC TTC ATA GGA GAG ACA GAT ATT GAT TAT GTA CAT GGT GTT 699
 Ile Val Val Phe Ile Gly Glu Thr Asp Ile Asp Tyr Val His Gly Val
 175 180 185
 GTA GCC AAC CTG GAG AAA GAA TTT TCT AAA GAA ATC AGT TCT GGC TTG 747
 Val Ala Asn Leu Glu Lys Glu Phe Ser Lys Glu Ile Ser Ser Gly Leu
 190 195 200
 GTG GAA GTC ATA TCA CCC CCT GAA AGC TAT TAT CCT GAC TTG ACA AAC 795
 Val Glu Val Ile Ser Pro Pro Glu Ser Tyr Tyr Pro Asp Leu Thr Asn
 205 210 215 220
 CTA AAG GAG ACA TTT GGA GAC TCC AAA GAA AGA GTA AGA TGG AGA ACA 843
 Leu Lys Glu Thr Phe Gly Asp Ser Lys Glu Arg Val Arg Trp Arg Thr
 225 230 235
 AAG CAA AAC CTA GAT TAC TGT TTT CTA ATG ATG TAT GCT CAA GAA AAG 891
 Lys Gln Asn Leu Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr Ala Gln Glu Lys

240 245 250
GGC ATA TAT TAC ATT CAG CTT GAA GAT GAT ATT ATT GTC AAA CAA AAT 939
Gly Ile Tyr Tyr Ile Gln Leu Glu Asp Asp Ile Ile Val Lys Gln Asn
255 260 265
TAT TTT AAT ACC ATA AAA AAT TTT GCA CTT CAA CTT TCT TCT GAG GAA 987
Tyr Phe Asn Thr Ile Lys Asn Phe Ala Leu Gln Leu Ser Ser Glu Glu
270 275 280
TGG ATG ATT CTA GAG TTT TCC CAG CTG GGC TTC ATT GGT AAA ATG TTT 1035
Trp Met Ile Leu Glu Phe Ser Gln Leu Gly Phe Ile Gly Lys Met Phe
285 290 295 300
CAA GCG CCG GAT CTT ACT CTG ATT GTA GAA TTC ATA TTC ATG TTT TAC 1083
Gln Ala Pro Asp Leu Thr Leu Ile Val Glu Phe Ile Phe Met Phe Tyr
305 310 315
AAG GAG AAA CCC ATT GAT TGG CTC CTG GAC CAT ATT CTC TGG GTG AAA 1131
Lys Glu Lys Pro Ile Asp Trp Leu Leu Asp His Ile Leu Trp Val Lys
320 325 330
GTC TGC AAC CCT GAA AAA GAT GCA AAA CAT TGT GAT AGA CAG AAA GCA 1179
Val Cys Asn Pro Glu Lys Asp Ala Lys His Cys Asp Arg Gln Lys Ala
335 340 345
AAT CTG CGA ATT CGC TTC AGA CCT TCC CTT TTC CAA CAT GTT GGT CTG 1227
Asn Leu Arg Ile Arg Phe Arg Pro Ser Leu Phe Gln His Val Gly Leu
350 355 360
CAC TCA TCA CTA TCA GGA AAA ATC CAA AAA CTC ACG GAT AAA GAT TAT 1275
His Ser Ser Leu Ser Gly Lys Ile Gln Lys Leu Thr Asp Lys Asp Tyr
365 370 375 380
ATG AAA CCA TTA CTT CTT AAA ATC CAT GTA AAC CCA CCT GCG GAG GTA 1323
Met Lys Pro Leu Leu Leu Lys Ile His Val Asn Pro Pro Ala Glu Val
385 390 395
TCT ACT TCC TTG AAG GTC TAC CAA GCG CAT ACG CTG GAG AAA ACT TAC 1371

Ser Thr Ser Leu Lys Val Tyr Gln Gly His Thr Leu Glu Lys Thr Tyr
 400 405 410
 ATG GGA GAG GAT TTC TTC TGG GCT ATC ACA CCG ATA GCT GGA GAC TAC 1419
 Met Gly Glu Asp Phe Phe Trp Ala Ile Thr Pro Ile Ala Gly Asp Tyr
 415 420 425
 ATC TTG TTT AAA TTT GAT AAA CCA GTC AAT GTA GAA AGT TAT TTG TTC 1467
 Ile Leu Phe Lys Phe Asp Lys Pro Val Asn Val Glu Ser Tyr Leu Phe
 430 435 440
 CAT AGC GGC AAC CAA GAA CAT CCT GGA GAT ATT CTG CTA AAC ACA ACT 1515
 His Ser Gly Asn Gln Glu His Pro Gly Asp Ile Leu Leu Asn Thr Thr
 445 450 455 460
 GTG GAA GTT TTG CCT TTT AAG AGT GAA GGT TTG GAA ATA AGC AAA GAA 1563
 Val Glu Val Leu Pro Phe Lys Ser Glu Gly Leu Glu Ile Ser Lys Glu
 465 470 475
 ACC AAA GAC AAA CGA TTA GAA GAT GGC TAT TTC AGA ATA GGA AAA TTT 1611
 Thr Lys Asp Lys Arg Leu Glu Asp Gly Tyr Phe Arg Ile Gly Lys Phe
 480 485 490
 GAG AAT GGT GTT GCA GAA GGA ATG GTG GAT CCA AGT CTC AAT CCC ATT 1659
 Glu Asn Gly Val Ala Glu Gly Met Val Asp Pro Ser Leu Asn Pro Ile
 495 500 505
 TCA GCC TTT CGA CTT TCA GTT ATT CAG AAT TCT GCT GTT TGG GCC ATT 1707
 Ser Ala Phe Arg Leu Ser Val Ile Gln Asn Ser Ala Val Trp Ala Ile
 510 515 520
 CTT AAT GAG ATT CAT ATT AAA AAA GCC ACC AAC TGATCATCTG AGAAACCAAC 1760
 Leu Asn Glu Ile His Ile Lys Lys Ala Thr Asn
 525 530 535
 ACATTTTTTC CTGTGAATTT GTTAATTAAA GATAGTTAAG CATGTATCTT TTTTTTATTT 1820
 CTACTTGAAC ACTACCTCTT GTGAAGTCTA CTGTAGATAA GACGATTGTC ATTTCCACTT 1880
 GGAAAGTGAA TCTCCCATAA TAATTGTATT TGTTTGAAAC TAAGCTGTCC TCAGATTTTA 1940

ACTTGACTCA AACATTTTTC AATTATGACA GCCTGTTAAT ATGACTTGTA CTATTTTGGT 2000
ATTATACTAA TACATAAGAG TTGTACATAT TGTTACATTC TTAAATTG AGAAAACTA 2060
ATGTTACATA CATTTTATGA AGGGGGTACT TTTGAGGTTT ACTTATTTTA CTATT 2115

配列番号 : 2 4

配列の長さ : 5 3 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Arg Leu Arg Asn Gly Thr Val Ala Thr Ala Leu Ala Phe Ile Thr
1 5 10 15
Ser Phe Leu Thr Leu Ser Trp Tyr Thr Thr Trp Gln Asn Gly Lys Glu
20 25 30
Lys Leu Ile Ala Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu Lys Glu Arg Leu
35 40 45
Arg Ile Ala Glu His Arg Ile Ser Gln Arg Ser Ser Glu Leu Asn Thr
50 55 60
Ile Val Gln Gln Phe Lys Arg Val Gly Ala Glu Thr Asn Gly Ser Lys
65 70 75 80
Asp Ala Leu Asn Lys Phe Ser Asp Asn Thr Leu Lys Leu Leu Lys Glu
85 90 95
Leu Thr Ser Lys Lys Ser Leu Gln Val Pro Ser Ile Tyr Tyr His Leu
100 105 110
Pro His Leu Leu Lys Asn Glu Gly Ser Leu Gln Pro Ala Val Gln Ile
115 120 125
Gly Asn Gly Arg Thr Gly Val Ser Ile Val Met Gly Ile Pro Thr Val
130 135 140
Lys Arg Glu Val Lys Ser Tyr Leu Ile Glu Thr Leu His Ser Leu Ile

145	150	155	160
Asp Asn Leu Tyr Pro Glu Glu Lys Leu Asp Cys Val Ile Val Val Phe			
	165	170	175
Ile Gly Glu Thr Asp Ile Asp Tyr Val His Gly Val Val Ala Asn Leu			
	180	185	190
Glu Lys Glu Phe Ser Lys Glu Ile Ser Ser Gly Leu Val Glu Val Ile			
	195	200	205
Ser Pro Pro Glu Ser Tyr Tyr Pro Asp Leu Thr Asn Leu Lys Glu Thr			
	210	215	220
Phe Gly Asp Ser Lys Glu Arg Val Arg Trp Arg Thr Lys Gln Asn Leu			
225	230	235	240
Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr Ala Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Tyr			
	245	250	255
Ile Gln Leu Glu Asp Asp Ile Ile Val Lys Gln Asn Tyr Phe Asn Thr			
	260	265	270
Ile Lys Asn Phe Ala Leu Gln Leu Ser Ser Glu Glu Trp Met Ile Leu			
	275	280	285
Glu Phe Ser Gln Leu Gly Phe Ile Gly Lys Met Phe Gln Ala Pro Asp			
	290	295	300
Leu Thr Leu Ile Val Glu Phe Ile Phe Met Phe Tyr Lys Glu Lys Pro			
305	310	315	320
Ile Asp Trp Leu Leu Asp His Ile Leu Trp Val Lys Val Cys Asn Pro			
	325	330	335
Glu Lys Asp Ala Lys His Cys Asp Arg Gln Lys Ala Asn Leu Arg Ile			
	340	345	350
Arg Phe Arg Pro Ser Leu Phe Gln His Val Gly Leu His Ser Ser Leu			
	355	360	365
Ser Gly Lys Ile Gln Lys Leu Thr Asp Lys Asp Tyr Met Lys Pro Leu			
	370	375	380

Leu Leu Lys Ile His Val Asn Pro Pro Ala Glu Val Ser Thr Ser Leu
385 390 395 400
Lys Val Tyr Gln Gly His Thr Leu Glu Lys Thr Tyr Met Gly Glu Asp
405 410 415
Phe Phe Trp Ala Ile Thr Pro Ile Ala Gly Asp Tyr Ile Leu Phe Lys
420 425 430
Phe Asp Lys Pro Val Asn Val Glu Ser Tyr Leu Phe His Ser Gly Asn
435 440 445
Gln Glu His Pro Gly Asp Ile Leu Leu Asn Thr Thr Val Glu Val Leu
450 455 460
Pro Phe Lys Ser Glu Gly Leu Glu Ile Ser Lys Glu Thr Lys Asp Lys
465 470 475 480
Arg Leu Glu Asp Gly Tyr Phe Arg Ile Gly Lys Phe Glu Asn Gly Val
485 490 495
Ala Glu Gly Met Val Asp Pro Ser Leu Asn Pro Ile Ser Ala Phe Arg
500 505 510
Leu Ser Val Ile Gln Asn Ser Ala Val Trp Ala Ile Leu Asn Glu Ile
515 520 525
His Ile Lys Lys Ala Thr Asn
530 535

配列番号 : 2 5

配列の長さ : 3 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TTCTCGAGAT GAGGCTCCGC AATGGAAGTG 30

配列番号 : 2 6

配列の長さ : 2 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

AGAAATGTGG GCTTCAGGGC TGGC 24

配列番号 : 2 7

配列の長さ : 3 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TTCTCGAGAT GAGGCTCCGC AATGGAAGTG 30

配列番号 : 2 8

配列の長さ : 2 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

AGAAATGTGG GCTTCAGGGC TGGC 24

配列番号 : 2 9

配列の長さ : 3 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TTCTCGAGAT GAGGCTCCGC AATGGAAGT 30

配列番号 : 3 0

配列の長さ : 2 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

AGAAATGTGG GCTTCAGGGC TGGC 24

配列番号 : 3 1

配列の長さ : 2 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TTCCATCACC TGCCACACCT GCTGG 25

配列番号 : 3 2

配列の長さ : 2 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACAACCCTCA GTCAGACAAG GAGG 24

配列番号 : 3 3

配列の長さ : 2 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACACCCCCAG AAATGTGGGC TTCA 24

配列番号 : 3 4

配列の長さ : 2 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATGACCGAGT CCTCCTTCTC CTGC 24

配列番号：3 5

配列の長さ：2 4

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATGCCCATCA CCACCGACAC TCCG 24

配列番号：3 6

配列の長さ：1 7 2 4

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

TGCAGCCTCG GCCCCGCGGG CGCCCGCCGC GCACCCGAGG AG ATG AGG CTC CGC 54

Met Arg Leu Arg

1

AAT GGC ACC TTC CTG ACG CTG CTG CTC TTC TGC CTG TGC GCC TTC CTC 102

Asn Gly Thr Phe Leu Thr Leu Leu Leu Phe Cys Leu Cys Ala Phe Leu

5

10

15

20

TCG CTG TCC TGG TAC GCG GCA CTC AGC GGC CAG AAA GGC GAC GTT GTG 150

Ser Leu Ser Trp Tyr Ala Ala Leu Ser Gly Gln Lys Gly Asp Val Val
 25 30 35
 GAC GTT TAC CAG CGG GAG TTC CTG GCG CTG CGC GAT CGG TTG CAC GCA 198
 Asp Val Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu Arg Asp Arg Leu His Ala
 40 45 50
 GCT GAG CAG GAG AGC CTC AAG CGC TCC AAG GAG CTC AAC CTG GTG CTG 246
 Ala Glu Gln Glu Ser Leu Lys Arg Ser Lys Glu Leu Asn Leu Val Leu
 55 60 65
 GAC GAG ATC AAG AGG GCC GTG TCA GAA AGG CAG GCG CTG CGA GAC GGA 294
 Asp Glu Ile Lys Arg Ala Val Ser Glu Arg Gln Ala Leu Arg Asp Gly
 70 75 80
 GAC GGC AAT CGC ACC TGG GGC CGC CTA ACA GAG GAC CCC CGA TTG AAG 342
 Asp Gly Asn Arg Thr Trp Gly Arg Leu Thr Glu Asp Pro Arg Leu Lys
 85 90 95 100
 CCG TGG AAC GGC TCA CAC CGG CAC GTG CTG CAC CTG CCC ACC GTC TTC 390
 Pro Trp Asn Gly Ser His Arg His Val Leu His Leu Pro Thr Val Phe
 105 110 115
 CAT CAC CTG CCA CAC CTG CTG GCC AAG GAG AGC AGT CTG CAG CCC GCG 438
 His His Leu Pro His Leu Leu Ala Lys Glu Ser Ser Leu Gln Pro Ala
 120 125 130
 GTG CGC GTG GGC CAG GGC CGC ACC GGA GTG TCG GTG GTG ATG GGC ATC 486
 Val Arg Val Gly Gln Gly Arg Thr Gly Val Ser Val Val Met Gly Ile
 135 140 145
 CCG AGC GTG CGG CGC GAG GTG CAC TCG TAC CTG ACT GAC ACT CTG CAC 534
 Pro Ser Val Arg Arg Glu Val His Ser Tyr Leu Thr Asp Thr Leu His
 150 155 160
 TCG CTC ATC TCC GAG CTG AGC CCG CAG GAG AAG GAG GAC TCG GTC ATC 582
 Ser Leu Ile Ser Glu Leu Ser Pro Gln Glu Lys Glu Asp Ser Val Ile
 165 170 175 180

GTG GTG CTG ATC GCC GAG ACT GAC TCA CAG TAC ACT TCG GCA GTG ACA 630
Val Val Leu Ile Ala Glu Thr Asp Ser Gln Tyr Thr Ser Ala Val Thr
185 190 195

GAG AAC ATC AAG GCC TTG TTC CCC ACG GAG ATC CAT TCT GGG CTC CTG 678
Glu Asn Ile Lys Ala Leu Phe Pro Thr Glu Ile His Ser Gly Leu Leu
200 205 210

GAG GTC ATC TCA CCC TCC CCC CAC TTC TAC CCT GAC TTC TCC CGC CTC 726
Glu Val Ile Ser Pro Ser Pro His Phe Tyr Pro Asp Phe Ser Arg Leu
215 220 225

CGA GAG TCC TTT GGG GAC CCC AAG GAG AGA GTC AGG TGG AGG ACC AAA 774
Arg Glu Ser Phe Gly Asp Pro Lys Glu Arg Val Arg Trp Arg Thr Lys
230 235 240

CAG AAC CTC GAT TAC TGC TTC CTC ATG ATG TAC GCG CAG TCC AAA GGC 822
Gln Asn Leu Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr Ala Gln Ser Lys Gly
245 250 255 260

ATC TAC TAC GTG CAG CTG GAG GAT GAC ATC GTG GCC AAG CCC AAC TAC 870
Ile Tyr Tyr Val Gln Leu Glu Asp Asp Ile Val Ala Lys Pro Asn Tyr
265 270 275

CTG AGC ACC ATG AAG AAC TTT GCA CTG CAG CAG CCT TCA GAG GAC TGG 918
Leu Ser Thr Met Lys Asn Phe Ala Leu Gln Gln Pro Ser Glu Asp Trp
280 285 290

ATG ATC CTG GAG TTC TCC CAG CTG GGC TTC ATT GGT AAG ATG TTC AAG 966
Met Ile Leu Glu Phe Ser Gln Leu Gly Phe Ile Gly Lys Met Phe Lys
295 300 305

TCG CTG GAC CTG AGC CTG ATT GTA GAG TTC ATT CTC ATG TTC TAC CGG 1014
Ser Leu Asp Leu Ser Leu Ile Val Glu Phe Ile Leu Met Phe Tyr Arg
310 315 320

GAC AAG CCC ATC GAC TGG CTC CTG GAC CAT ATT CTG TGG GTG AAA GTC 1062
Asp Lys Pro Ile Asp Trp Leu Leu Asp His Ile Leu Trp Val Lys Val

325 330 335 340
 TGC AAC CCC GAG AAG GAT GCG AAG CAC TGT GAC CGG CAG AAA GCC AAC 1110
 Cys Asn Pro Glu Lys Asp Ala Lys His Cys Asp Arg Gln Lys Ala Asn
 345 350 355
 CTG CGG ATC CGC TTC AAA CCG TCC CTC TTC CAG CAC GTG GGC ACT CAC 1158
 Leu Arg Ile Arg Phe Lys Pro Ser Leu Phe Gln His Val Gly Thr His
 360 365 370
 TCC TCG CTG GCT GGC AAG ATC CAG AAA CTG AAG GAC AAA GAC TTT GGA 1206
 Ser Ser Leu Ala Gly Lys Ile Gln Lys Leu Lys Asp Lys Asp Phe Gly
 375 380 385
 AAG CAG GCG CTG CGG AAG GAG CAT GTG AAC CCG CCA GCA GAG GTG AGC 1254
 Lys Gln Ala Leu Arg Lys Glu His Val Asn Pro Pro Ala Glu Val Ser
 390 395 400
 ACG AGC CTG AAG ACA TAC CAG CAC TTC ACC CTG GAG AAA GCC TAC CTG 1302
 Thr Ser Leu Lys Thr Tyr Gln His Phe Thr Leu Glu Lys Ala Tyr Leu
 405 410 415 420
 CGC GAG GAC TTC TTC TGG GCC TTC ACC CCT GCC GCG GGG GAC TTC ATC 1350
 Arg Glu Asp Phe Phe Trp>Ala Phe Thr Pro Ala Ala Gly Asp Phe Ile
 425 430 435
 CGC TTC CGC TTC TTC CAA CCT CTA AGA CTG GAG CGG TTC TTC TTC CGC 1398
 Arg Phe Arg Phe Phe Gln Pro Leu Arg Leu Glu Arg Phe Phe Phe Arg
 440 445 450
 AGT GGG AAC ATC GAG CAC CCG GAG GAC AAG CTC TTC AAC ACG TCT GTG 1446
 Ser Gly Asn Ile Glu His Pro Glu Asp Lys Leu Phe Asn Thr Ser Val
 455 460 465
 GAG GTG CTG CCC TTC GAC AAC CCT CAG TCA GAC AAG GAG GCC CTG CAG 1494
 Glu Val Leu Pro Phe Asp Asn Pro Gln Ser Asp Lys Glu Ala Leu Gln
 470 475 480
 GAG GGC CGC ACC GCC ACC CTC CGG TAC CCT CGG AGC CCC GAC GGC TAC 1542

Glu Gly>Arg Thr Ala Thr Leu Arg Tyr Pro Arg Ser Pro Asp Gly Tyr
 485 490 495 500
 CTC CAG ATC GGC TCC TTC TAC AAG GCA GTG GCA GAG GGA GAG GTG GAC 1590
 Leu Gln Ile Gly Ser Phe Tyr Lys Gly Val Ala Glu Gly Glu Val Asp
 505 510 515
 CCA GCC TTC GGC CCT CTG GAA GCA CTG CGC CTC TCG ATC CAG ACG GAC 1638
 Pro Ala Phe Gly Pro Leu Glu Ala Leu Arg Leu Ser Ile Gln Thr Asp
 520 525 530
 TCC CCT GTG TGG GTG ATT CTG AGC GAG ATC TTC CTG AAA AAG GCC GAC 1686
 Ser Pro Val Trp Val Ile Leu Ser Glu Ile Phe Leu Lys Lys Ala Asp
 535 540 545 548
 TAAGCTGCGG GCTTCTGAGG GTACCCTGTG GCCAGCCC 1724

配列番号 37

配列の長さ : 548

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Arg Leu Arg Asn Gly Thr Phe Leu Thr Leu Leu Leu Phe Cys Leu
 1 5 10 15
 Cys Ala Phe Leu Ser Leu Ser Trp Tyr Ala Ala Leu Ser Gly Gln Lys
 20 25 30
 Gly Asp Val Val Asp Val Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu Arg Asp
 35 40 45
 Arg Leu His Ala Ala Glu Gln Glu Ser Leu Lys Arg Ser Lys Glu Leu
 50 55 60
 Asn Leu Val Leu Asp Glu Ile Lys Arg Ala Val Ser Glu Arg Gln Ala

65	70	75	80
Leu Arg Asp Gly Asp Gly Asn Arg Thr Trp Gly Arg Leu Thr Glu Asp			
85	90	95	
Pro Arg Leu Lys Pro Trp Asn Gly Ser His Arg His Val Leu His Leu			
100	105	110	
Pro Thr Val Phe His His Leu Pro His Leu Leu Ala Lys Glu Ser Ser			
115	120	125	
Leu Gln Pro Ala Val Arg Val Gly Gln Gly Arg Thr Gly Val Ser Val			
130	135	140	
Val Met Gly Ile Pro Ser Val Arg Arg Glu Val His Ser Tyr Leu Thr			
145	150	155	160
Asp Thr Leu His Ser Leu Ile Ser Glu Leu Ser Pro Gln Glu Lys Glu			
165	170	175	
Asp Ser Val Ile Val Val Leu Ile Ala Glu Thr Asp Ser Gln Tyr Thr			
180	185	190	
Ser Ala Val Thr Glu Asn Ile Lys Ala Leu Phe Pro Thr Glu Ile His			
195	200	205	
Ser Gly Leu Leu Glu Val Ile Ser Pro Ser Pro His Phe Tyr Pro Asp			
210	215	220	
Phe Ser Arg Leu Arg Glu Ser Phe Gly Asp Pro Lys Glu Arg Val Arg			
225	230	235	240
Trp Arg Thr Lys Gln Asn Leu Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr Ala			
245	250	255	
Gln Ser Lys Gly Ile Tyr Tyr Val Gln Leu Glu Asp Asp Ile Val Ala			
260	265	270	
Lys Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Met Lys Asn Phe Ala Leu Gln Gln Pro			
275	280	285	
Ser Glu Asp Trp Met Ile Leu Glu Phe Ser Gln Leu Gly Phe Ile Gly			
290	295	300	

Lys Met Phe Lys Ser Leu Asp Leu Ser Leu Ile Val Glu Phe Ile Leu
 305 310 315 320
 Met Phe Tyr Arg Asp Lys Pro Ile Asp Trp Leu Leu Asp His Ile Leu
 325 330 335
 Trp Val Lys Val Cys Asn Pro Glu Lys Asp Ala Lys His Cys Asp Arg
 340 345 350
 Gln Lys Ala Asn Leu Arg Ile Arg Phe Lys Pro Ser Leu Phe Gln His
 355 360 365
 Val Gly Thr His Ser Ser Leu Ala Gly Lys Ile Gln Lys Leu Lys Asp
 370 375 380
 Lys Asp Phe Gly Lys Gln Ala Leu Arg Lys Glu His Val Asn Pro Pro
 385 390 395 400
 Ala Glu Val Ser Thr Ser Leu Lys Thr Tyr Gln His Phe Thr Leu Glu
 405 410 415
 Lys Ala Tyr Leu Arg Glu Asp Phe Phe Trp Ala Phe Thr Pro Ala Ala
 420 425 430
 Gly Asp Phe Ile Arg Phe Arg Phe Phe Gln Pro Leu Arg Leu Glu Arg
 435 440 445
 Phe Phe Phe Arg Ser Gly Asn Ile Glu His Pro Glu Asp Lys Leu Phe
 450 455 460
 Asn Thr Ser Val Glu Val Leu Pro Phe Asp Asn Pro Gln Ser Asp Lys
 465 470 475 480
 Glu Ala Leu Gln Glu Gly Arg Thr Ala Thr Leu Arg Tyr Pro Arg Ser
 485 490 495
 Pro Asp Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Ser Phe Tyr Lys Gly Val Ala Glu
 500 505 510
 Gly Glu Val Asp Pro Ala Phe Gly Pro Leu Glu Ala Leu Arg Leu Ser
 515 520 525
 Ile Gln Thr Asp Ser Pro Val Trp Val Ile Leu Ser Glu Ile Phe Leu

530

535

540

Lys Lys Ala Asp

545

548

配列番号 : 3 8

配列の長さ : 2 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TTCTCGAGGA GATGAGGCTC CGCAATGGC 29

配列番号 : 3 9

配列の長さ : 3 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

AATCTAGAAA TGTGGGCTTC AGGGCTGGC 30

配列番号 : 4 0
配列の長さ : 2 8
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : 合成DNA

配列

CCCTCGAG ATG GGG GTG CAC GAA TGT CC 28
Met Gly Val His Glu Cys Pro

配列番号 : 4 1
配列の長さ : 4 8
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : 合成DNA
アンチセンス : Yes

配列

CTTTTTCCTT GTTAACTCCT TTAGTATTGG GCGCCCAGG ACTGGGAG 48

配列番号 : 4 2
配列の長さ : 4 8
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : 合成DNA

配列

CTCCCAGTCC TGGGCGCCCC AATACTAAAG GAGTTAACAA GCAAAAAG 48

配列番号 : 4 3

配列の長さ : 4 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : Yes

配列

CTTCCTTCAT TTTGCAATAA ATGAGGGGCG CCCAGGACTG GGAG 44

配列番号 : 4 4

配列の長さ : 4 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : Yes

配列

ATTAACTTC TCTCTTCACT GTAGGGGCGC CCAGGACTGG GAG 43

配列番号 : 4 5

配列の長さ : 4 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CTCCCAGTCC TGGGCGCCCC TCATTTATTG CAAAATGAAG GAAG 44

配列番号：46

配列の長さ：43

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CTCCCAGTCC TGGGCGCCCC TACAGTGAAG AGAGAAGTTA AAT 43

配列番号：47

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

TTCTAGAA TCA CCC TTC CGC AAC ACC 26

TRM Gly Glu Ala Val Gly

配列番号：48

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : Yes

配列

TTCTAGAA TCA AGG CAG AAC TTC CAC CG 28

TRM Pro Leu Val Glu Val Thr

配列番号 : 49

配列の長さ : 38

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : Yes

配列

TTCTAGAA TCA TTT AAA TAG GAT GTA GTC TCC AGC TAC 38

TRM Lys Phe Leu Ile Tyr Asp Gly Ala Val

配列番号 : 50

配列の長さ : 34

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : Yes

配列

TTCTAGAA TCA TGG TTT CAT GTA ATC TTT ATC CG 34

TRM Pro Lys Met Tyr Asp Lys Asp Thr

配列番号 : 5 1

配列の長さ : 1 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TTC ATG AGG CTC CGA AAT G 19

Met Arg Leu Arg Asn Gly

配列番号 : 5 2

配列の長さ : 2 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : Yes

配列

CAAGCT TCA GTT TGT GAC TTT TTT AAT AT 29

TRM Asn Thr Val Lys Lys Ile His

配列番号 : 5 3

配列の長さ : 2 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TC ATG ATA CTA AAG GAG TTA ACA AGC A 27

Met Ile Leu Lys Glu Leu Thr Ser Lys

配列番号 : 5 4

配列の長さ : 5 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : Yes

配列

CAAGCT TCA GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTT TGT GAC TTT 39

TRM His His His His His His Asn Thr Val Lys

TTT AAT ATG GAT 51

Lys Ile His Ile

配列番号 : 5 5

配列の長さ : 1 8

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

CAAGCT TCA GTG GTG GTG 18

TRM His His His

配列番号：5 6

配列の長さ：3 2

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TC ATG ATA TTA AAG GAG TTA ACA AGC AAA AAA 32

Met Ile Leu Lys Glu Leu Thr Ser Lys Lys

配列番号：5 7

配列の長さ：5 1

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

CAAGCT TCA GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTT GGT GGC TTT 39

TRM His His His His His His Asn Thr Ala Lys

TTT AAT ATG AAT 51

Lys Ile His Ile

配列番号 : 5 8

配列の長さ : 4 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : Yes

配列

CAAGCT TCA GTG GTG GTG GTG GTG GTG TGG TTT CAT ATA 39

TRM His His His His His His Pro Lys Met Tyr

ATC TTT ATC C 49

Asp Lys Asp

配列番号 : 5 9

配列の長さ : 1 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TTC ATG AGG CTC CGC AAT G . 19

Met Arg Leu Arg Asn Gly

配列番号 : 6 0

配列の長さ : 1 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : Yes

配列

CAGGTTGAGC TCCTTGGA 18

配列番号 : 6 1

配列の長さ : 1 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TCCAAGGAGC TCAACCTG 18

配列番号 : 6 2

配列の長さ : 4 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：合成DNA

アンチセンス：Yes

配列

CAAGCT TCA GTG GTG GTG GTG GTG GTC GGC CTT TTT CAG GA 44

TRM His His His His His His Asp Als Lys Lys Leu Phe

配列番号：63

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

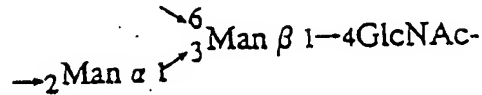
配列

CCC ATG GGC CGC CTA ACA GAG GA 23

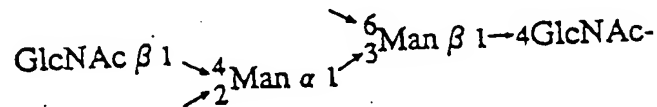
Met Gly Arg Leu Thr Glu Asp

請求の範囲

1. 糖供与体としてUDP-GlcNAcを、糖受容体として下記式：



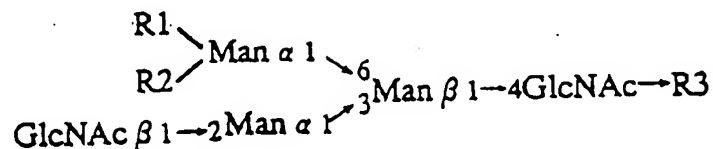
で表される部分構造を有する糖質をそれぞれ基質とし、下記式：



で表される部分構造を有する糖質を生成する作用を有する $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ。

2. 糖受容体となる糖質が、オリゴ糖、多糖、複合糖質（糖ペプチド、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカン）およびそれらの誘導体である請求項1記載の $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ。

3. 糖受容体が、下記式：



(R1: H-, Man $\alpha 1 \rightarrow 6$, または GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 6$)

R2: H-, Man $\alpha 1 \rightarrow 3$, または GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$

R3: -OH, $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc \rightarrow R4

R4: -OH, -H, -ピリジルアミン, または -ペプチド鎖)

で表される部分構造を有する糖質である請求項1記載の $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ。

4. 配列番号1~14にそれぞれ記載のアミノ酸配列を部分配列として有する $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ。

5. 配列番号18記載のアミノ酸配列、または配列番号18記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつ $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性をもたらすアミノ酸配列を有する $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ。
6. 配列番号18記載のアミノ酸配列の少なくとも93位から383 位までのアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつ $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性をもたらすアミノ酸配列を有する $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ。
7. 配列番号24記載のアミノ酸配列、または配列番号24記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつ $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性をもたらすアミノ酸配列を有する $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ。
8. 配列番号24記載のアミノ酸配列の少なくとも94位から383 位までのアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつ $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性をもたらすアミノ酸配列を有する $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ。
9. 配列番号37記載のアミノ酸配列、または配列番号37記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつ $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性をもたらすアミノ酸配列を有する $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ。
10. 配列番号37記載のアミノ酸配列の少なくとも91位から390 位までのアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されたものであって、かつ $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性をもたらすアミノ酸配列を有する $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ。
11. 請求項5または6記載の $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼをコードする $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝

子。

1 2. 請求項7または8記載の $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼをコードする $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子。

1 3. 請求項9または10記載の $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼをコードする $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子。

1 4. 配列番号17記載の塩基配列を有する $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子。

1 5. 配列番号23記載の塩基配列を有する $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子。

1 6. 配列番号36記載の塩基配列を有する $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子。

1 7. 請求項11~16いずれかに記載の $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子をベクターDNA に挿入したことを特徴とする組み換え体DNA。

1 8. 請求項11~16いずれかに記載の $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子の一部もしくは全部を含む染色体断片。

1 9. 請求項17記載の組み換え体DNA を含む宿主細胞。

2 0. 請求項18に記載の染色体断片を人為的に導入した宿主細胞。

2 1. 生物試料から請求項1~3に記載の $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを精製する方法。

2 2. 請求項19記載の宿主細胞を培地に培養し、培養物から $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを採取することを特徴とする $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの製造法。

2 3. 請求項20に記載の宿主細胞を培地に培養し、培養物から $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを採取することを特徴とする $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの製造法。

2 4. 請求項19に記載の宿主細胞を起源とする宿主の分泌物・体液・ホモジネー

トから $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを採取することを特徴とする $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの製造法。

25. 請求項20に記載の宿主細胞を起源とする宿主の分泌物・体液・ホモジネートから $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを採取することを特徴とする $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの製造法。

26. 請求項1～3 に記載の $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼにより糖鎖構造を改変した糖質。

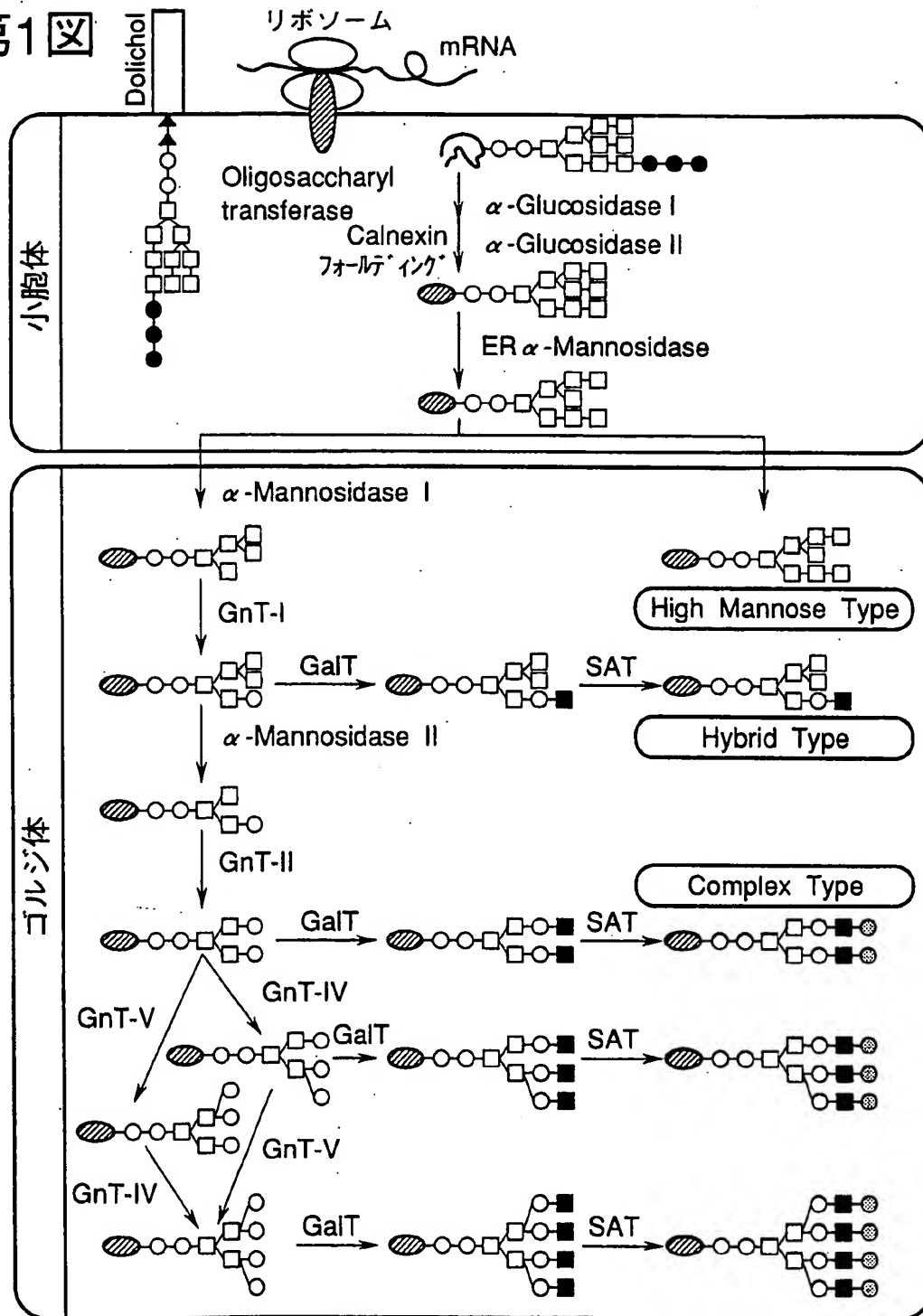
27. オリゴ糖、糖ペプチド、糖タンパク質、およびそれらの誘導体のいずれかである請求項26記載の糖質。

28. 宿主細胞に、請求項11～16いずれかに記載の $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子を導入し、該宿主細胞により生産される糖タンパク質の糖鎖分岐構造を改変する方法。

29. 請求項28に記載の方法により生産される、糖鎖分岐構造を改変した糖タンパク質。

30. エリスロポエチンである請求項29記載の糖タンパク質。

第1図



Asn結合型糖鎖生合成経路

1/17

差替え用紙 (規則26)

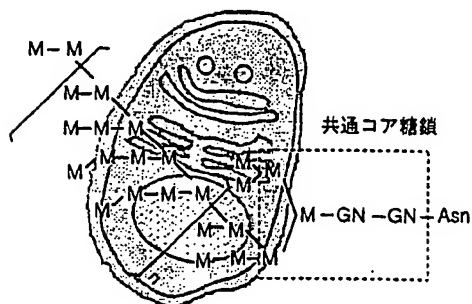
07/23/2004, EAST Version: 1.4.1

第2図

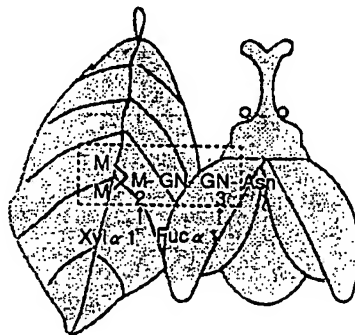
Asn 結合型糖鎖のバリエーション

[竹内 誠；和光純薬時報 64, 18-19, 1996；図1より改変]

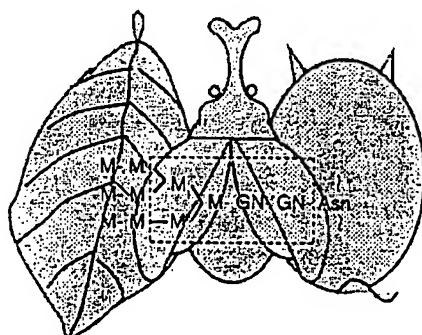
a. マンナン型



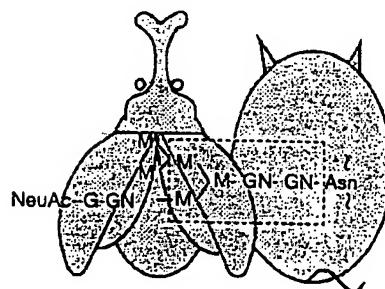
b. キシロハイマンノース型



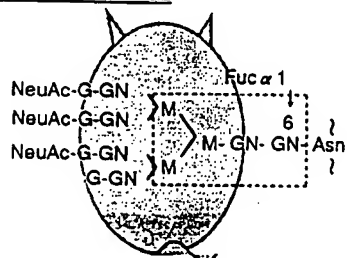
c. ハイマンノース型



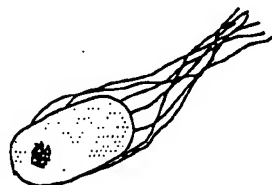
d. ハイブリッド型



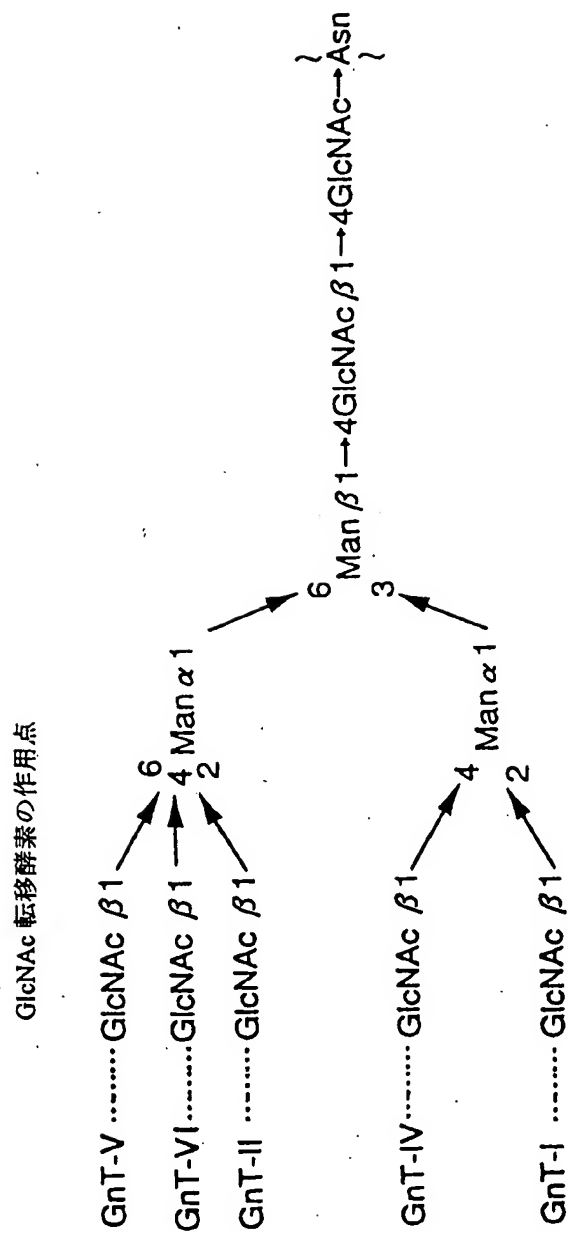
e. コンプレックス型



f. 原核細胞

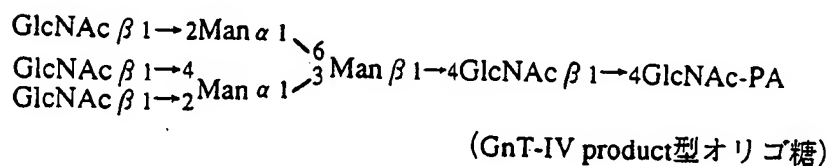
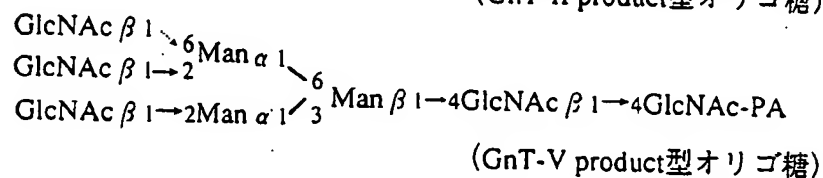
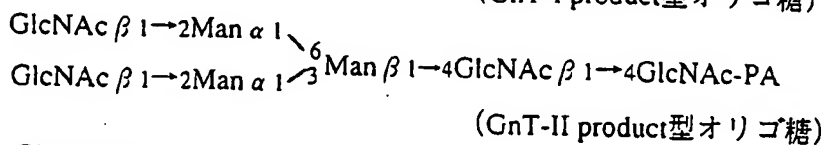
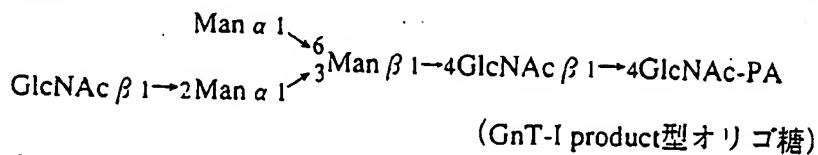
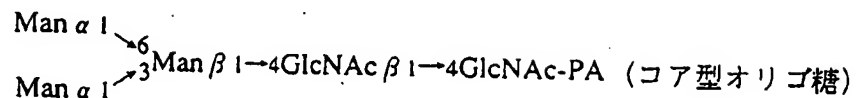


第3図



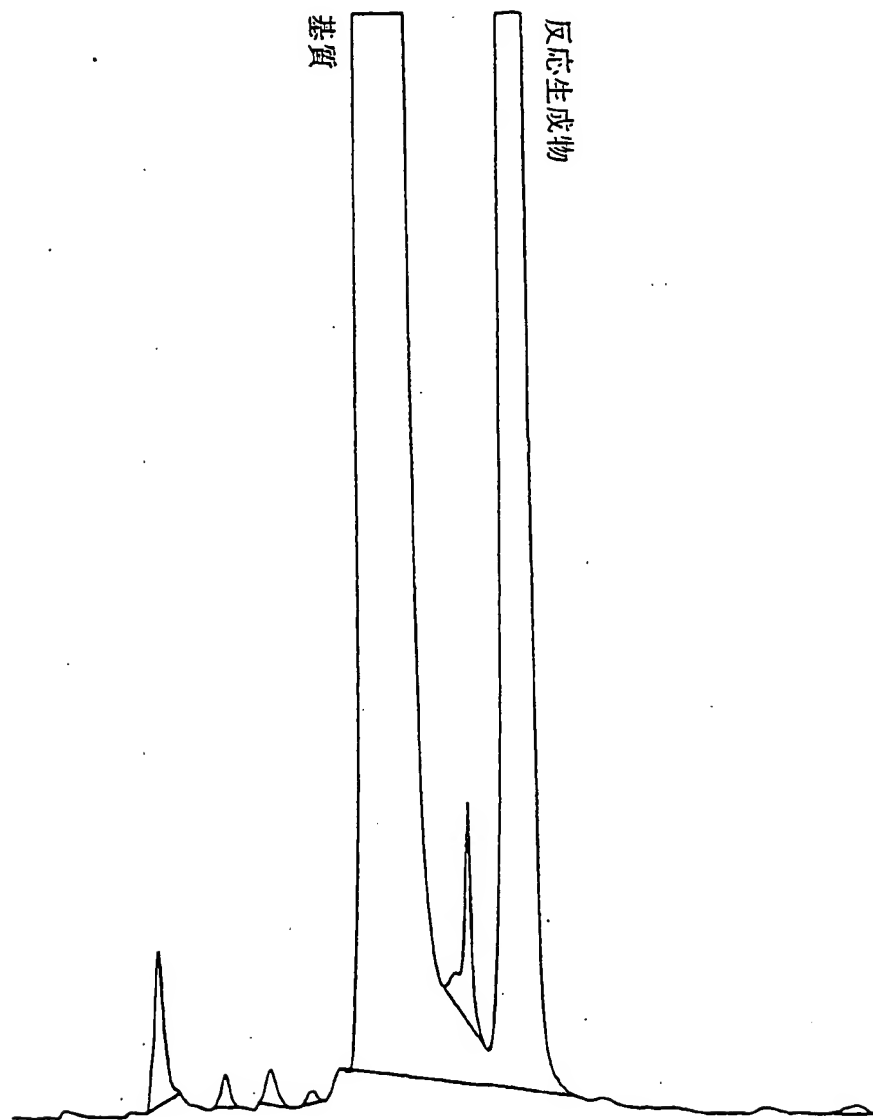
第4図

オリゴ糖の呼称及びその構造

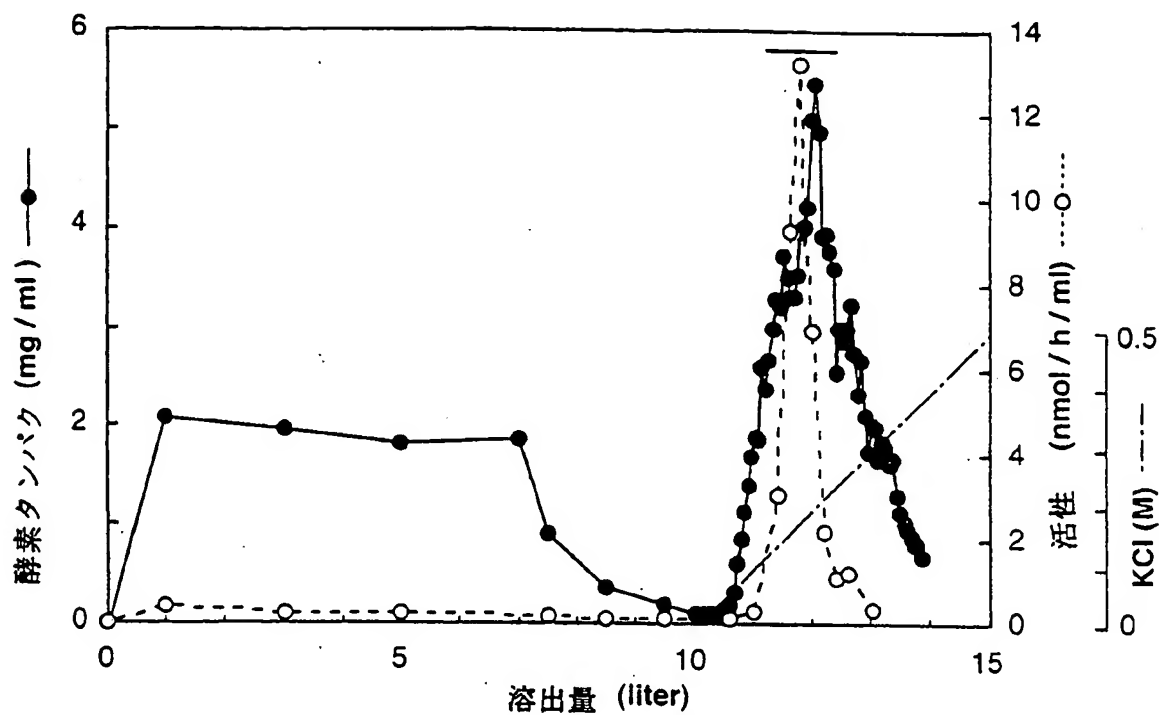


第5図

GnT-IV反応生成物の高速液体クロマトグラム

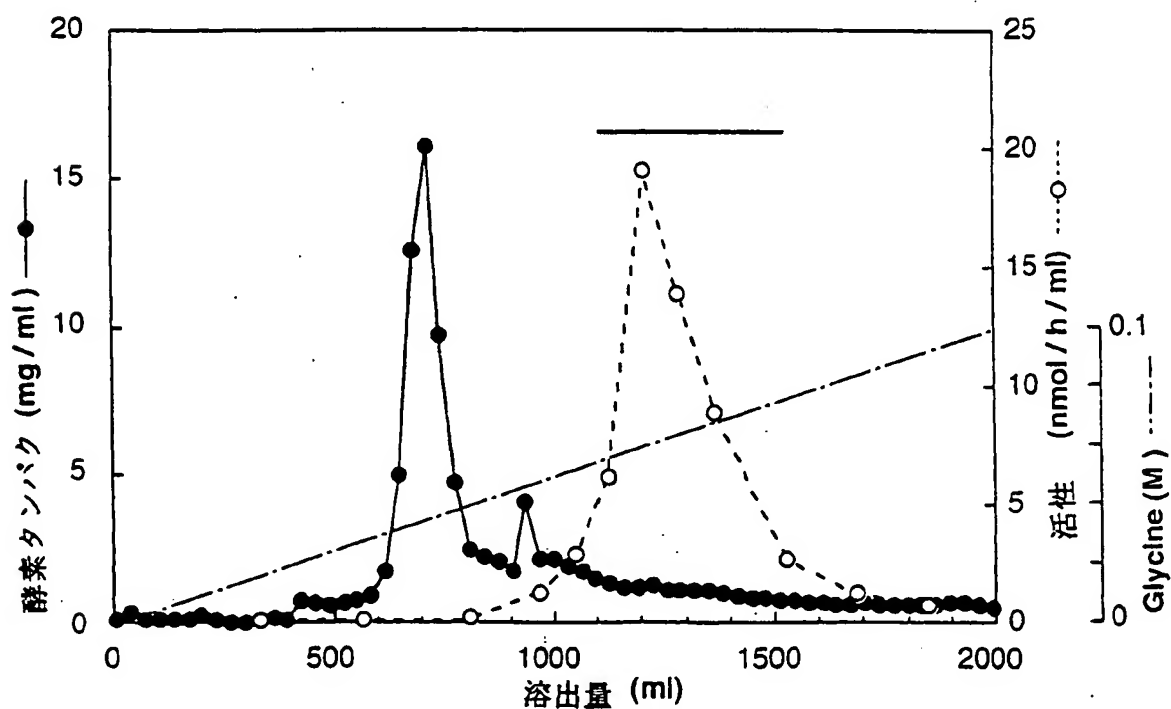


第6図



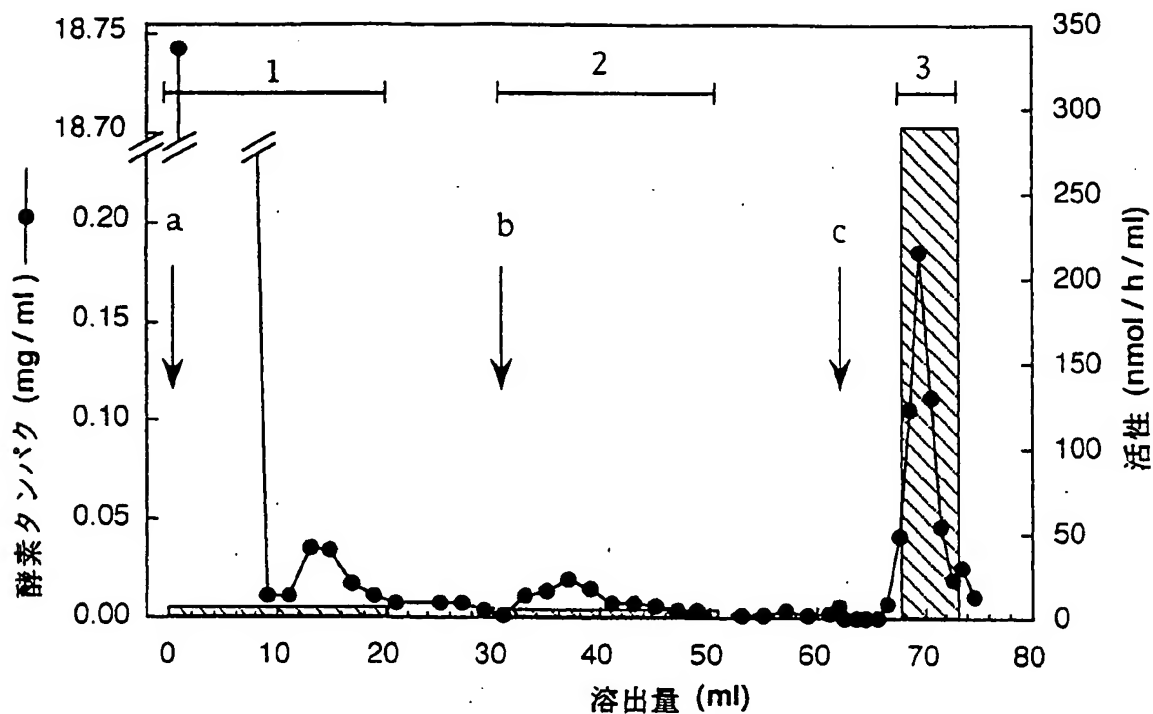
Q Sepharose FF クロマトグラフィー

第7図



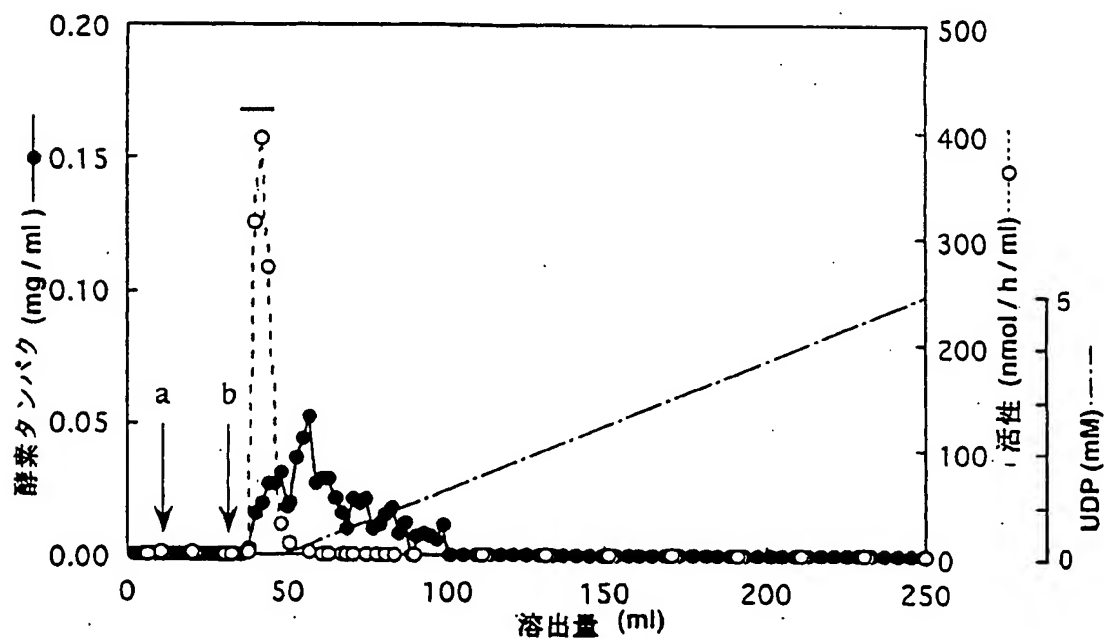
銅キレートSepharose FF クロマトグラフィー

第8図



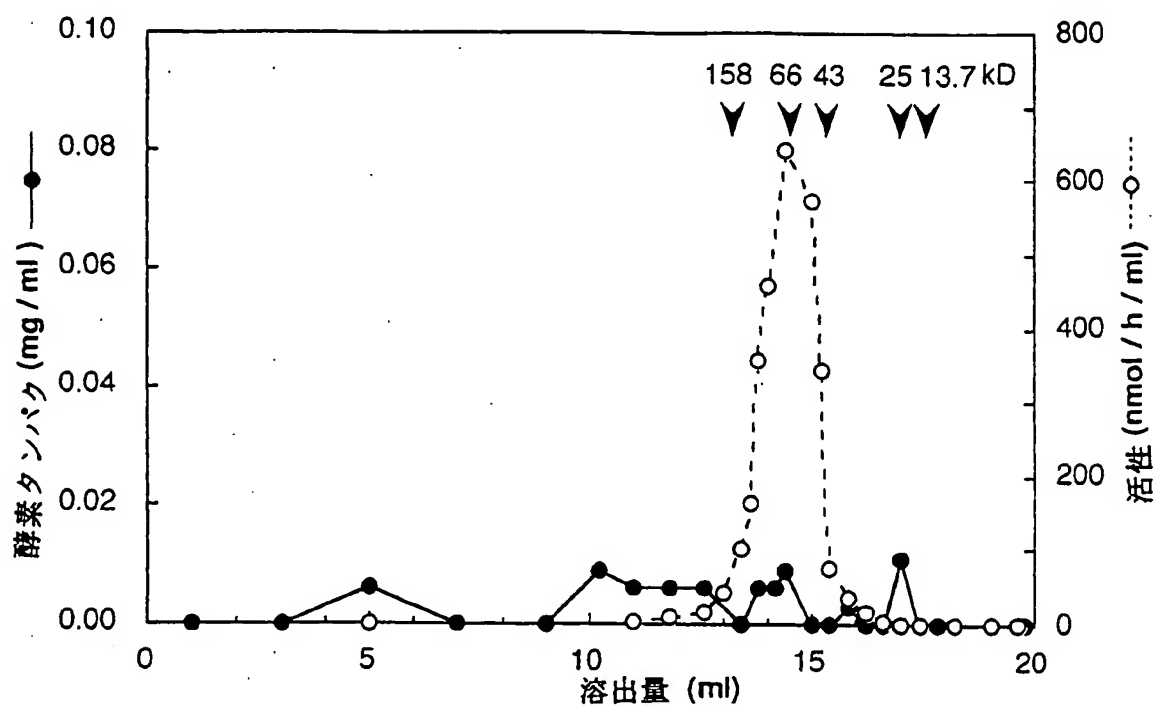
UDP-Hexanamine Agarose アフィニティークロマトグラフィー I

第9図



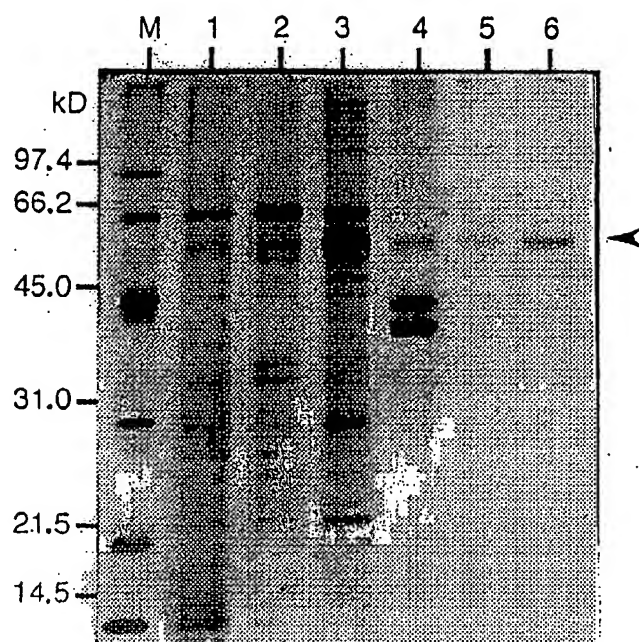
UDP-Hexanamine Agarose アフィニティークロマトグラフィーII

第10図



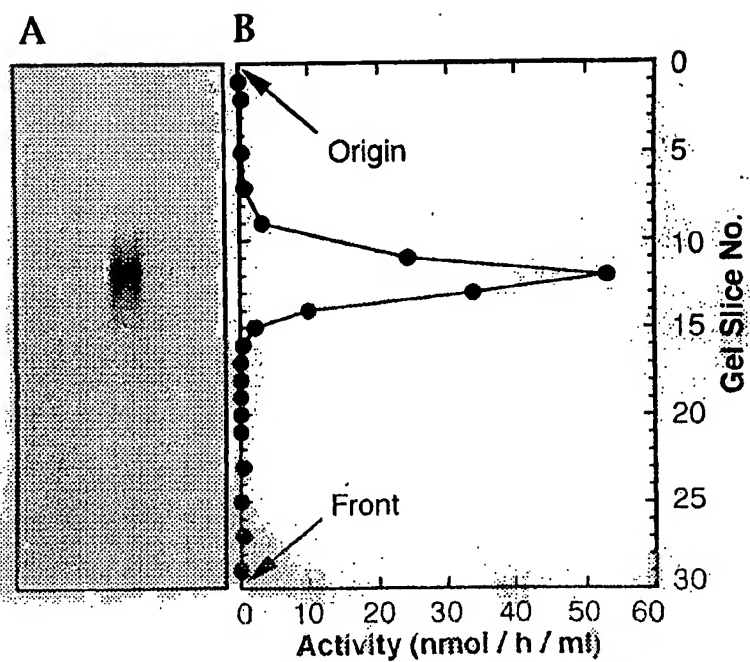
Superdex 200 ゲルクロマトグラフィー

第11図



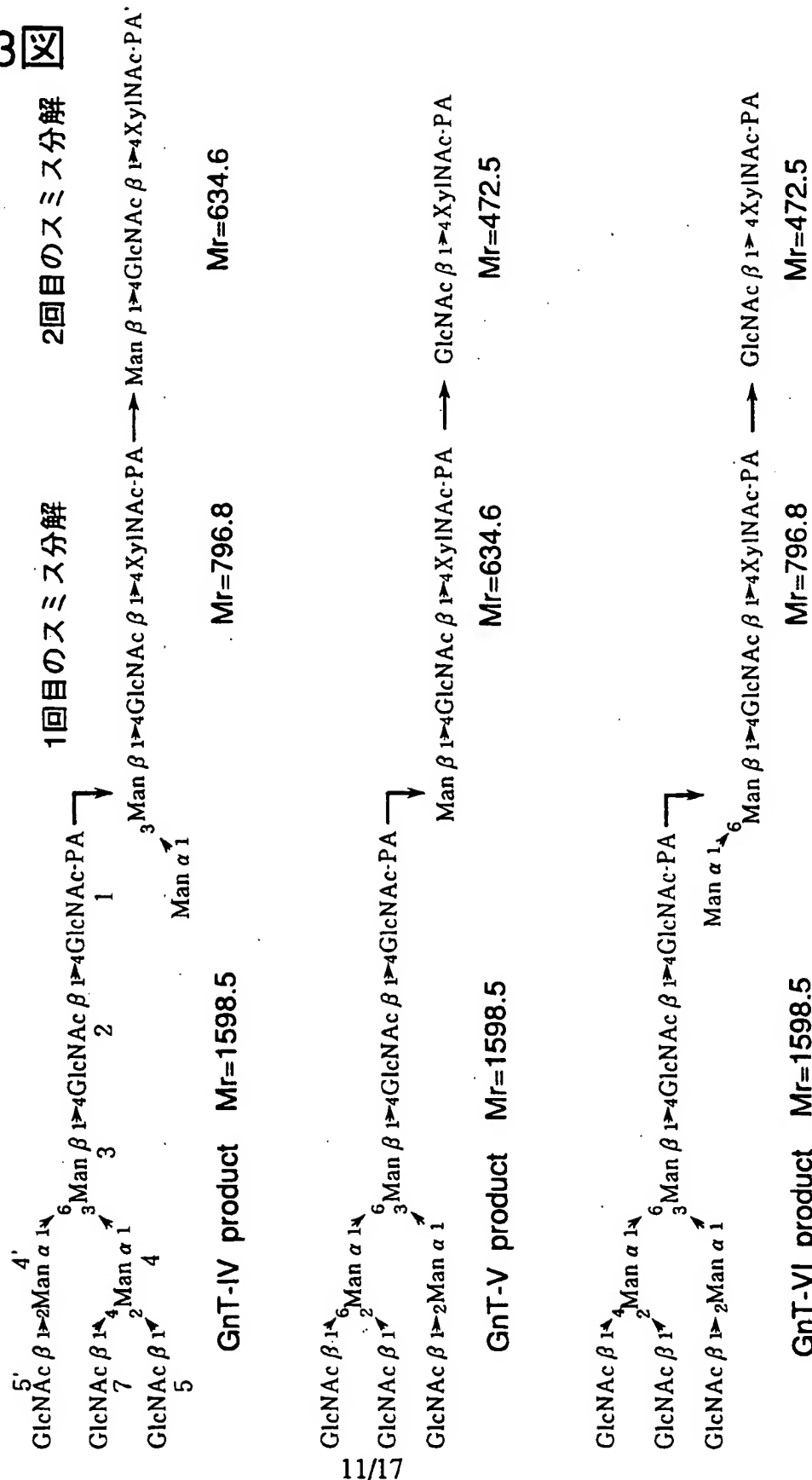
精製GnT-IVのSDS-PAGE

第12図



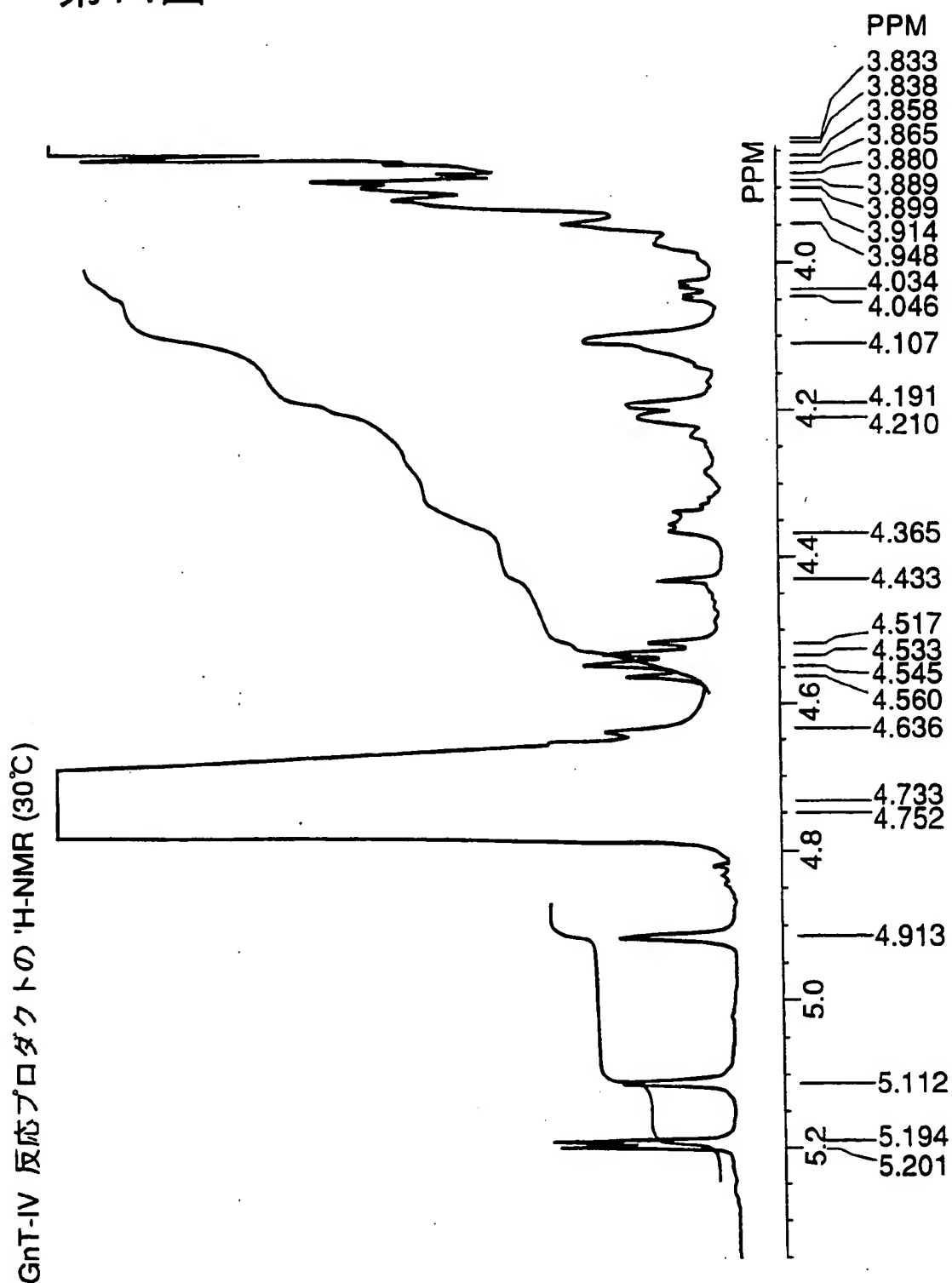
GnT-IV標品のNativeゲル電気泳動と活性

第13図

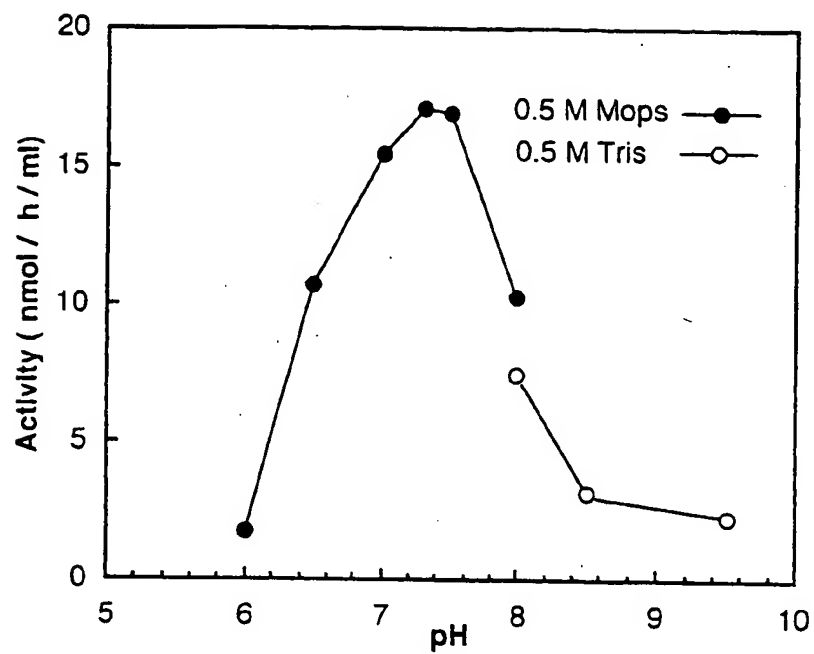


差替え用紙 (規則26)

第14図

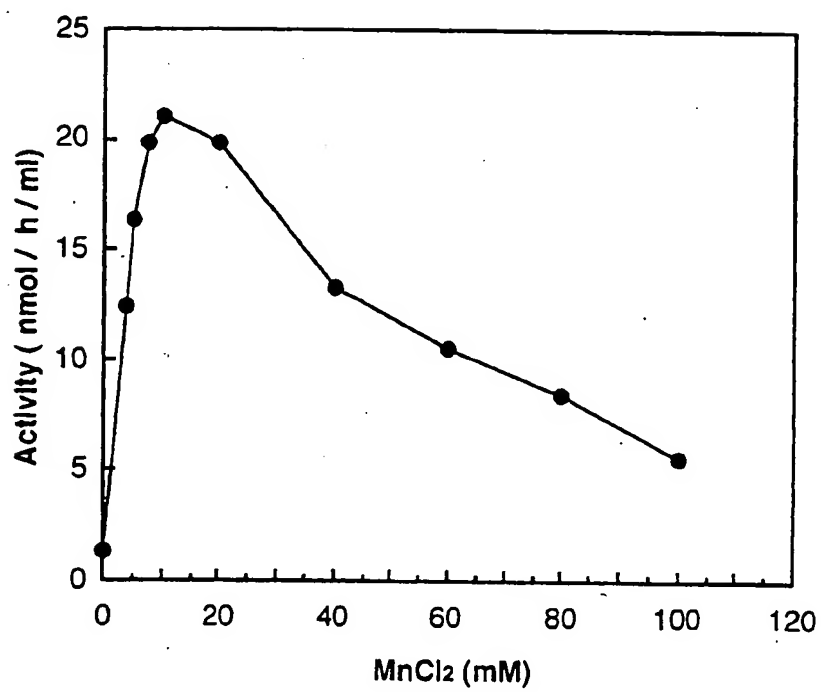


第15図

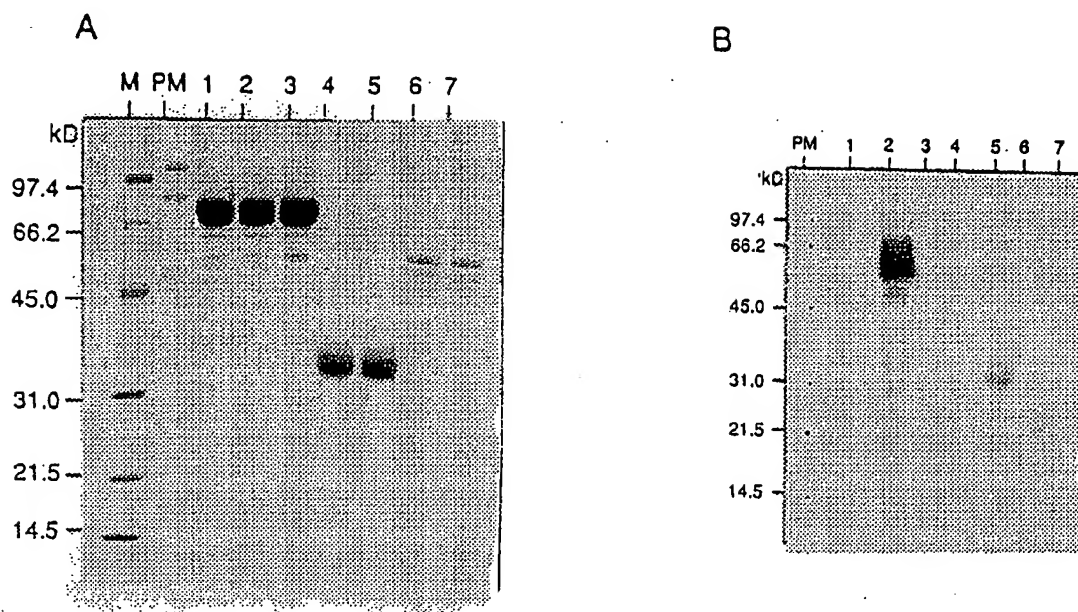


GnT-IVの至適pH

第16図

GnT-IVの至適Mn²⁺濃度

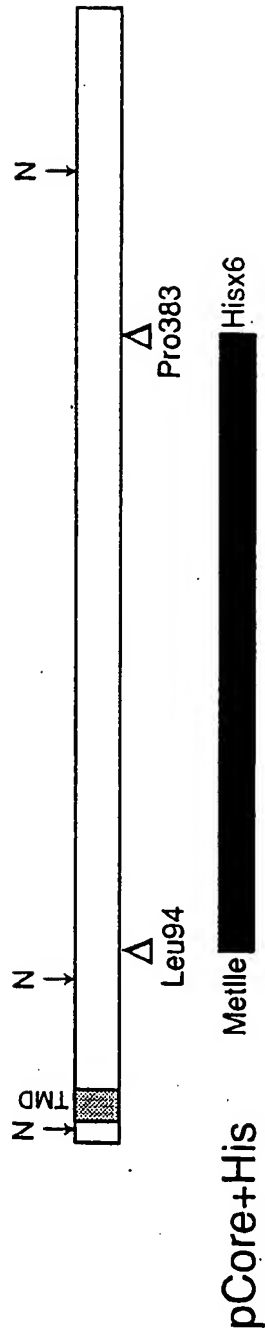
第17図



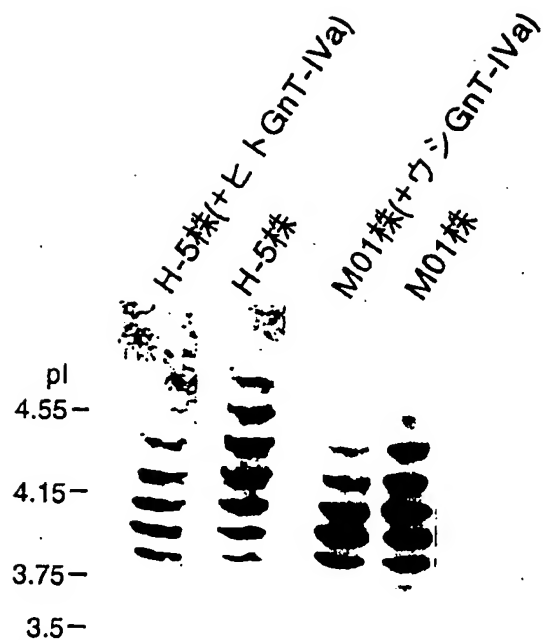
糖タンパク質に対する GnT-IV の作用

第18図

ヒトGnT-IVaのオープンリーディングフレームと
pCore-His発現ベクターに含まれる領域



第19図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04546

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N9/10, C12N15/54, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C12P19/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N9/10, C12N15/54, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C12P19/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG),
PIR/SWISS-PROT/GENESEQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	Glycoconjugate J., Vol. 14, No. 6 (1997) MT Minowa et al., "Cloning and expression of a newly purified N-acetylglucosaminyl transferase", p.767	1-30
X/A	Glycobiology, Vol. 1, No. 4 (1991) M. Takeuchi et al., "Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins", p.337-346	26, 27, 29, 30/1-25, 28

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
March 10, 1998 (10. 03. 98)

Date of mailing of the international search report
March 24, 1998 (24. 03. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁸ C12N9/10, C12N15/54, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02,
C12P19/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁸ C12N9/10, C12N15/54, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02,
C12P19/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), REGISTRY(STN), BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG),
PIR/SWISS-PROT/GENESEQ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	Glycoconjugate J., Vol. 14, No. 6(1997) MT Minowa et al.; "Cloning and expression of a newly purified N-acetylglucosaminyl transferase", p. 767	1-30
X/A	Glycobiology, Vol. 1, No. 4(1991) M. Takeuchi et al.; "Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins", p. 337-346	26, 27, 29, 30 /1-25, 28

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.03.98

国際調査報告の発送日

24.03.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植野 浩志

印

4B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3449